

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР –
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

на правах рукописи

Булгаков Александр Дмитриевич

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОСНОВНЫХ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ
ИНФЕКЦИЙ В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ РФ**

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Алипер Тарас Иванович

Москва – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. <u>Репродуктивно-респираторный синдром свиней</u>	12
1.1.1. Характеристика возбудителя.....	13
1.1.2. Патогенез.....	14
1.1.3. Эпизоотологические данные.....	17
1.1.4. Лабораторная диагностика.....	19
1.1.5. Иммуитет и специфическая профилактика.....	23
1.2. <u>Цирковирусные болезни свиней</u>	26
1.2.1. Характеристика возбудителя.....	27
1.2.2. Патогенез.....	29
1.2.3. Эпизоотологические данные.....	34
1.2.4. Лабораторная диагностика.....	36
1.2.5. Иммуитет и специфическая профилактика.....	37
1.3. <u>Грипп свиней</u>	39
1.3.1. Характеристика возбудителя.....	40
1.3.2. Патогенез.....	42
1.3.3. Эпизоотологические данные.....	43
1.3.4. Лабораторная диагностика.....	46
1.3.5. Иммуитет и специфическая профилактика.....	48
Заключение.....	50
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. <u>Материалы и методы</u>	51
2.1.1. Материалы.....	51
2.1.1.1. Исследуемый материал.....	51
2.1.1.2. Коммерческие наборы для исследования.....	53
2.1.1.3. Оборудование и расходные материалы.....	54
2.1.2. Методы.....	55

2.1.2.1. Полимеразная цепная реакция.....	55
2.1.2.2. Секвенирование.....	58
2.1.2.3. Иммуноферментный анализ.....	58
2.1.2.4. Реакция торможения гемагглютинации.....	59
2.1.2.5. Конструирование рекомбинантной плазмиды.....	59
2.2. <u>Результаты исследований</u>	62
2.2.1. Оценка распространенности и анализ генетической вариабельности вируса РРСС в свиноводческих хозяйствах РФ	62
2.2.2. Оценка распространенности и анализ генетической вариабельности ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах РФ	68
2.2.3. Оценка распространенности подтипов вируса гриппа А в свиноводческих хозяйствах РФ.	73
2.2.4. Оценка распространенности вируса РРСС-1, ЦВС-2 и ВГА в форме моно- и смешанных инфекций.....	75
2.2.5. Разработка тест-системы для выявления ЦВС-2b методом полимеразной цепной реакции.....	77
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	86
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
5. ВЫВОДЫ.....	92
6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	94
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	108

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

РНК - рибонуклеиновая кислота

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ВРБС - вирусные респираторные болезни свиней

ЦВС-1(PCV-1) - цирковирс свиней 1 типа

ЦВС-2 (PCV-2) - цирковирс свиней 2 типа

ЦВБС - цирковирсные болезни

ВРРСС (PRRSV) - вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней

РРСС (PRRS) - репродуктивнреспираторный синдром свиней

РКВС - респираторный коронавирс свиней

ГС - грипп свиней

ВГС - вирус гриппа свиней

ВБА - вирус болезни Ауэски

СПМИ - синдром послеотъемного мультисистемного истощения

СДНС - синдрома дерматита и нефропатии свиней

РНС - респираторные нарушения свиней

РРФС - расстройства репродуктивной функции свиней

ПЦР (PCR) - полимеразная цепная реакция

ПЦР в реальном времени - Real-time PCR

ОТ- ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ИФА (ELISA) - иммуноферментный анализ

РГА - реакция гемагглютинации

РТГА - реакция торможения гемагглютинации

РН - реакция нейтрализации

МФА - метод флюоресцирующих антител

ИПО - иммунопероксидазное окрашивание

МНИ - метод непрямой иммунофлуоресценции

ГАЕ - гемагглютинирующие единицы

ЦНС - центральная нервная система

ЛПС - липополисахариды

НА - гемагглютинин

НА - нейраминидаза

нм – нанометр

п.о. - пар оснований

КК - культура клеток

КЭ - куриный эмбрион

ЭИД - эмбриональная инфекционная доза

ТЦД - титр цитопатического действия

ТИД - титр инфицирующей дозы

РК-15 - перевиваемая культура клеток почки поросенка

МА-104 - перевиваемая культура клеток почки эмбриона макаки-резус

MARK-145 – клонированный вариант перевиваемой культуры клеток МА-104

ORF (Open Reading Frame) - открытая рамка считывания

kDa - килодальтон

САР - белок-активатор катаболитных оперонов

IL - интерлейкин

TNF – фактор некроза опухоли

Real-time PCR - ПЦР в реальном времени

N белок - нуклеокапсидный белок

M белок - матриксный белок

rN - рекомбинантный капсидный белок

ВВЕДЕНИЕ

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% [27, 30]. 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 [4, 34, 67]. Согласно современной классификации [30] к основным (первичным) возбудителям ВРБС, способным самостоятельно вызывать проявление клинических признаков болезни, относятся вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (вирус РРСС), цирковирс 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 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis* играет главную роль в развитии респираторного симптомокомплекса у свиней, значительно утяжеляя течение болезни [54, 78]. Диагностика ВРБС основана на выделении возбудителя, выявлении его генома или специфических антител [29, 48]. 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 [29], 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 [92] 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.

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 [30]. 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 [1, 8, 44]. Результаты многолетних исследований по молекулярно-генетическому анализу и определению функционально значимых генетических мутаций вируса РРСС были обобщены в докторской диссертации Т.В.Гребенниковой (2005) [11]. Результаты исследований специалистов НПО «НАРВАК», проведенных в отношении ЦВС-2, обобщены и представлены в ряде публикаций [31, 49]. 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) [20], посвященные оценке эпизоотической ситуации по РРСС в России, изучению особенностей клинико-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) [17] продемонстрирован комплексный подход к изучению патогенеза цирковирусной инфекции свиней, показана диагностическая эффективность ИФА и ПЦР в практических условиях, экспериментально и научно обоснованы схемы применения рекомбинантных вакцин, позволяющие в короткие сроки снизить заболеваемость и повысить сохранность и среднесуточные привесы поросят. Среди многочисленных работ, посвященных ВГА, подавляющее большинство затрагивает изучение подтипов вируса, вызывающих грипп у человека и птиц. Среди последних известны результаты исследований в области эволюции высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005 – 2009 гг.), проведенных М.Ю. Щелкановым с соавтр. и обобщенных им в докторской диссертации (2010) [51]. В отношении гриппа свиней новых наработок в нашей стране практически нет, а немногочисленные публикации носят обзорный характер.

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.

Научная новизна работы

Получены новые обобщённые данные о распространённости 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 - характерная 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: H1N2, H2N3 и H3N8.

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).

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.

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.

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.

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.).

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.

Объём и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 110 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Нарушения респираторной функции свиней является значительной проблемой свиноводства по всему миру, они наносят серьезный ущерб, как крупным предприятиям, так и личному подворью. Наиболее часто выявляемыми вирусными респираторными заболеваниями свиней, являются – респираторно - репродуктивный синдром свиней (РРСС) (12-42%), цирковиральная болезнь свиней (ЦВБС) (18-65%) и грипп свиней (ГС) (10-77%) [30, 35]. В связи с этим нами были выбраны именно эти вирусных агенты для проведения исследования.

1.1. Репродуктивно – респираторный синдром свиней

Репродуктивно – респираторного синдром свиней (ВРРСС) – вирусное контагиозное заболевание, характеризующееся абортами, рождением мертвых поросят, преждевременными опоросами или задержанием опороса и другими нарушениями в репродуктивной системе, а также поражением органов дыхания и синюшностью в области шеи, живота, вульвы, а также ушей. Болезнь была впервые описана в США в 1986 году и первоначально получила название «загадочная болезнь свиней». Позднее она была обнаружена в Канаде (1987), в Голландии и Германии (1990), Бельгии, Испании, Англии (1991), а впоследствии и во многих других странах Европы, а также Азии и Африки. О широкой циркуляции вируса до его официального обнаружения свидетельствует выявление специфических антител в ретроспективных исследованиях ранее собранных сывороток [3]. Наличие вируса РРСС в популяции свиней, по крайней мере, с 1979 года, было установлено в ретроспективных исследованиях сывороток, проводимых в Канаде [59]. На первом международном симпозиуме по РРСС, проводимом в 1992 году в США, было принято официальное название болезни «репродуктивно-респираторный синдром свиней». Также болезнь проходила под названием: голубой аборт, «синее ухо», эндемический поздний аборт свиней, бесплодие и респираторный синдром свиней. Свободными от РРСС считаются

Швейцария, страны Океании и австралийский континент. Во всех остальных странах с развитым свиноводством это заболевание широко распространено и наносит значительные экономические убытки [6].

Вирус РРСС повышает восприимчивость организма животных к другим возбудителям, участвует в развитии смешанных инфекций как бактериальной, так и вирусной природы [32, 107]. Вторичные инфекции значительно увеличивают экономические потери от поражения ВРРСС, их присутствие оказывает сильное влияние на смертность новорожденных поросят. Серопозитивных к ВРРСС поросят выявляют в 40-80% обследованных хозяйств. В неблагополучных хозяйствах специфические антитела регистрируют у 10-95% свиней [26, 28]. В России РРСС считают одним из важнейших и требующих наиболее пристального внимания, заболеваний свиней [24].

1.1.1. Характеристика возбудителя

Возбудитель болезни – вирус РРСС – был выделен из альвеолярных макрофагов поросёнка в Голландии и получил название Lelystad virus [94]. В Америке вирус РРСС был выделен и охарактеризован на клеточной линии CL2621 [25]. Он принадлежит к семейству *Arteriviridae*, роду *Arterivirus*. В это семейство так же входят вирусы артериита лошадей, гемморагической лихорадки обезьян и повышения уровня лактатдегидрогеназы мышей. Семейства вирусов *Arteriviridae* и *Togaviridae* объединены в порядок *Nidovirales* [56, 69, 101]. Существует 2 генетически различных типа ВРРСС: Европейский и Североамериканский, прототипом которых являются соответственно штамм «Lelystad» и штамм VR-2332. Они обладают степенью генетического родства между собой около 66%.

Вирус является оболочечным и обладает чувствительностью к жировым растворителям. Вирион диаметром 40-65 нм содержит изометрический нуклеокапсид диаметром 20-35 нм. В его составе обнаружено шесть структурных белков – негликолизированный нуклеокапсидный белок N, негликолизированный трансмембранный белок M и четыре N - гликозилированных белка молекулярной массой от 25 до 50 kDa. Его плавающая плотность в хлориде цезия – 1.19 г/мл. Кратковременная инкубация в неионном детергенте способствует выходу

вирусного нуклеокапсида из оболочки. Вирус неустойчив при pH ниже 5.0 и выше 7.0, полностью инактивируется эфиром и хлороформом. Он проявляет низкую устойчивость при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. При температуре + 4°C сохраняет свои биологические свойства в течение месяца, при 21°C – 6 суток, при 37°C – 1 - 2 суток, при 56°C – в течение 6 - 20 минут. Во внешней среде (на деревянной и стальной поверхностях, обуви, подстилке, моче, фекалиях) сохраняется сутки. Вирус полностью инактивируется при воздействии на него липидорастворяющими агентами – эфиром, хлороформом. В жидкой среде вирус более устойчив (4-11 дней) [6, 56].

Геном представлен одиночной полиаденилированной цепью РНК, положительной полярности, размером около 15,1 – 15,4 тысяч нуклеотидов. 3'-конец генома полиаденилирован, на 5'-конце присутствует CAP-структура. Из 8 перекрывающихся открытых рамок считывания (ORF) самыми большими являются 1a и 1b, кодирующие вирусную полимеразу, они занимают 80% генома. За ними следуют 6 ORF, кодирующих в основном структурные белки, которые транслируются с образованием субгеномных РНК. У американских штаммов обнаружена некодирующая область (размером 10 п.о.), разделяющая ORF 4 и ORF 5. Кодирующая область генома ограничена 5'- и 3'-нетранслируемыми областями.

1.1.2. Патогенез

Патогенез вируса РРСС недостаточно изучен. Предполагается, что вирус проникает в организм через назальный эпителий, миндалины и альвеолярные макрофаги. Размножаясь в этих клетках вирус вызывает виремию, что приводит к возникновению пневмонии, миокардитов, энцефалитов, ринитов, васкулитов, лимфаденопатий и в органах-мишенях [95]. Доказано, что ВРРСС вызывает у свиней персистентную инфекцию [28]. Персистентно инфицированные животные способны передавать вирус посредством прямого и непрямого контакта. При прямом контакте заражение может происходить вплоть до 22 недели после инфицирования. Инкубационный период (от момента контакта с инфекционным агентом до появления первого клинического признака) от 3-5 дней до 18-37. При введении свободных от ВРРСС свиней в помещения, в которых содержались

животные, у которых клинические признаки заболевания исчезли более 4 месяцев назад, вновь введенные свиньи инфицировались ВРСС. Вирус РРСС можно выделить из легких, плазмы, сыворотки и цельной крови в течение более 5 недель после инфицирования, при этом, начиная со 2 недели после инфицирования также возможно обнаружение антител. Репродуктивные симптомы обычно не проявляются ранее 25 дня после инфицирования. Описано серьезное снижение жизнеспособности новорожденных поросят при заражении супоросных свиноматок. Возможно заражение на ранней стадии супоросности [55, 95]. При заражении *per vagina* не было обнаружено репликации вируса в матке, хотя микроскопические поражения матки и плаценты наблюдались. Поэтому до сих пор нет полного понимания причин повышения эмбриональной смертности и появления репродуктивных проблем [10, 107].

Макроскопических повреждений при вскрытии после полевых вспышек РРСС, без серьезного осложнения вторичными бактериальными инфекциями, не было обнаружено. В Нидерландах были описаны наиболее обширные поражения респираторного тракта, включающие риниты, интерстициальную и катаральную пневмонию.

В США вирусный штамм АТС-2332 ВРСС вызывал интерстициальную пневмонию, лимфоноуклеарный энцефалит и лимфоидный мононуклеарный миокардит, но никаких ЦНС-синдромов и поражений сердца не наблюдалось ни при естественном, ни при экспериментальном заражении. При инфицировании вирусом РРСС наблюдалось резкое снижение количества альвеолярных макрофагов в бронхоальвеолярной жидкости, а также снижение количества моно- и лимфоцитов в течение первых трех дней инфекции, но к 14-му дню происходило восстановление их количества до нормального.

Имеются данные, что инфицирование свиней вирусом РРСС совместно с интратрахеальным введением липополисахаридов (ЛПС) бактериального происхождения вызывает возникновение сильной респираторной патологии, в то время как отдельно вирус РРСС или отдельно ЛПС не вызывают ярких респираторных заболеваний. При совместном введении вируса с ЛПС, уровень

патологических изменений в легких, количество биоактивного фактора некроза опухолей α (TNF- α), тучных клеток, интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), титр вируса РРСС в легочном лаваже были в 10-100 раз выше, чем при раздельном [107]. Таким образом, ВРРСС подавляет функцию иммунной системы, размножаясь в ее клетках, и на фоне этого усиливаются патологии, вызываемые другими возбудителями, приводя к более серьезным нарушениям в организме животного. Ранее была доказана причастность вируса РРСС к патологии поросят, называемой «синдром послеотъемного мультисистемного истощения» (СПМИ). Сейчас это утверждение считается спорным, так как вирус обнаруживают лишь у 30% животных с данной патологией [98]. Значительные различия в вирулентности штаммов вируса РРСС наблюдали у экспериментально зараженных свиней. Существенно различались по силе выраженности респираторные признаки, ректальная температура, макро- и микроскопические поражения легких при заражении 9 различными изолятами ВРРСС американского типа. Американский изолят VR2431 (ISU3927), обладающий низкой вирулентной активностью, а также европейский штамм Lelystad, вызывали тахипноэ, диспноэ и кратковременную лихорадку. Американские высоковирулентные изоляты вызывали сильную лихорадку, затрудненное дыхания, вялость, отсутствие аппетита и кожный цианоз в виде пятен [86, 98]. Серьезные вспышки острого или атипичного РРСС в Америке, подтвердили, что в настоящее время циркулируют более высоковирулентные изоляты вируса РРСС, чем ранее. Выраженная нейровирулентность ВРРСС при заражении неонатальных поросят, связана с инфицированием отдельными изолятами вируса. Было сделано предположение, что значительные генетические изменения могли привести к смене клеточного тропизма вируса РРСС [95].

Изоляты вируса РРСС различаются между собой по вирулентности для свиней (высоко-, слабо- и авирулентные), действию на клетки и ткани (цито- и нецитолитические), степени и возможности их репродукции в разных системах культивирования, по выраженности бляшкообразования (крупно-, средне- и

мелкобляшечные), антигенности. Этим, в определенной мере, объясняется различное проявление болезни у свиней разных пород и возрастных групп [1].

1.1.3. Эпизоотологические данные

К ВРРСС восприимчивы свиньи всех пород и возрастных групп, но чаще эту болезнь регистрируют у свиноматок, поросят первых дней жизни и отъемного возраста, а иногда и периода откорма. При РРСС нарушаются функции репродуктивной и респираторной систем. Репродуктивную форму отмечают у свиноматок и хряков, а респираторную – преимущественно у поросят-сосунов и поросят после отъема. Экспериментально животных удается инфицировать разными путями: интраназально, интратрахеально, внутримышечно, в грудную полость, совместным содержанием больных и здоровых свиней [8]. Также в экспериментальных условиях, удалось воспроизвести репродуктивную дисфункцию у свиноматок на различных стадиях супоросности [61].

В благополучные по РРСС фермы, вирус обычно попадает с инфицированными животными, через обувь или инвентарь, с некоторыми видами птиц, распространяется аэрогенно. Не до конца изучена роль человека в трансмиссии вируса, но его обнаруживают в небольших количествах на одежде, в слюне, в смывах с пальцев рук людей, находившихся в контакте с животными. Вирус может передаваться через сперму хряков, в ней он сохраняет свою активность течение 2 недель. В следствие переболевания РРСС, у хряков отмечают импотенцию и ухудшение качества спермы [47].

Вирус РРСС обладает способностью преодолевать трансплацентарный барьер во второй половине супоросности и инфицировать плод. Как известно, абортированные плоды содержат вирус в высокой концентрации и могут служить источником возбудителя инфекции. Если же плод выживает, то поросенок становится носителем вируса.

Дикие кабаны также могут быть как источником возбудителя инфекции, так и резервуаром ВРРСС. Неизвестно, могут ли другие виды животных служить природным резервуаром вируса [52, 76].

По литературным данным инкубационный период в случае завоза инфицированных животных на ферму обычно составляет от 2 до 5 недель. После поступления на ферму серопозитивных хряков и свинок, болезнь проявляется через 3-5 месяцев и характеризуется массовым рождением у свиноматок мертвых поросят. Особенно быстро инфекция распространяется среди свиней в условиях скученного содержания, степень поражения может достигать 90% животных. Острый период заболевания на фермах длится 1-4 месяца и зависит от размеров фермы (чем больше ферма, тем дольше происходит процесс постепенного охвата всего свиноголовья). В особо крупных свинокомплексах вспышка может продолжаться до года и более. Болезнь обостряется, как правило, в холодное время года, а с наступлением теплоты ситуация постепенно нормализуется [16, 47].

Происхождение вируса РРСС не известно, наличие двух разных групп изолятов считается результатом длительной дивергентной эволюции [111].

Ретроспективный анализ сывороток свиней из Канады установил наличие вируса РРСС по меньшей мере с 1979 года [59]. С 1996 года, после использования в Дании живых вакцин против РРСС, основанных на вирусе американского типа, американские изоляты стали выявляться и на территории западной Европы [58]. Также они встречаются и на территории Китая и Японии [100]. Зарегистрировано выявление европейских изолятов на территории США. На территории Российской Федерации вирус был впервые обнаружен в 1991 году в Курская область, в ходе широкомасштабных исследований. В нашей стране в основном обнаруживается вирус европейского типа [26].

Источником возбудителя инфекции являются больные и латентно инфицированные свиньи разных возрастных групп, которые выделяют вирус с фекалиями, мочой, слюной, носовыми и глазными секретами. Предварительные наблюдения Zimmerman с соавторами позволили предположить, что вирус может переноситься перелетными птицами, но более поздние научные исследования опровергли эту гипотезу. По мнению автора, птицы могут служить механическими векторами переноса вируса, поскольку ни одно животное, кроме

свиньи, не способно поддерживать репликацию вируса РРСС [87]. Потенциально, передавать вирус через зараженную кровь могут насекомые типа moskitov и мух, но они не могут служить биологическими векторами.

При наличии у животного вируса РРСС обостряется течение других вирусных инфекций. Это хорошо изучено на примере СПМИ и синдрома дерматита и нефропатии свиней (СДНС), вызванных цирковиром свиней 2 типа (ЦВС-2) [98, 99], а также при экспериментальном заражении свиней вирусом гриппа А или респираторным коронавирусом. По информации некоторых исследователей европейские изоляты вируса РРСС сами по себе не способны вызывать респираторные расстройства у животных-гнотобионтов. Однако, ведущая роль вируса РРСС как одного из этиологических агентов многофакторного респираторного заболевания у свиней, сомнению не подвергается [1].

В более ранних исследованиях, была подтверждена способность вируса РРСС повышать восприимчивость организма к другим возбудителям. Например, в экспериментах с заражением свиней *Streptococcus suis* типа 2 (вызывающим менингит), гнойный менингит развивался, лишь, когда свиньи были одновременно инфицированы и вирусом РРСС и *S. Suis* [33, 74].

1.1.4. Лабораторная диагностика

При постановке предварительного диагноза заболевания основываются на эпизоотологических данных, клинических признаках и патологоанатомических изменениях, окончательный диагноз ставится по результатам обнаружения вируса или вирусного антигена в тканях и органах животных, а так же по результатам серологических исследований [46].

Клинические симптомы РРСС не являются достаточными для постановки диагноза заболевания, поскольку схожие респираторные и/или репродуктивные признаки свойственны и другим болезням свиней [53, 67].

Посмертно определяют патологоанатомические изменения в органах животного. Выявляют возбудителя болезни методами молекулярной диагностики и иммунохимии в селезенке, тимусе, костном мозге, лимфоузлах, миндалинах,

сердце, мозге, печени и почках, а также сыворотке крови и альвеолярной жидкости [5].

Наиболее высокочувствительным и специфичным методом детекции вируса РРСС является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в различных ее вариантах [8, 79]. Этот метод может быть использован для выявления возбудителя РРСС в сперме животных, которую не используют в иммуноферментном анализе, в сыворотке крови, даже когда там не детектируются вирусоспецифические антитела. Возможна количественная оценка вируса РРСС в пробе методом ПЦР в реальном времени (Real-time PCR).

Для рутинной диагностики РРСС используют серологические тесты, которые просты в постановке и обладают высокой специфичностью и чувствительностью. В лабораторной практике широко применяют иммунопероксидазное окрашивание (ИПО) зараженного вирусом монослоя культуры клеток [68] и непрямой иммунофлуоресцентный анализ (МФА) [90], которые основаны на специфическом связывании антител с антигенами вируса, размноженного в альвеолярных макрофагах свиней или в культуре клеток МА-104, а также различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Очищенный культуральный вирусный антиген использован в непрямом [55, 56] и конкурентном методах ИФА, пригодном в том числе для дифференциации антител против европейского и американского типов вируса РРСС [58]. В качестве «золотого стандарта» в настоящее время в основном применяют коммерческий диагностический набор «HerdCheck PRRS antibody ELISA» (IDEXX, Westbrook, Maine), в состав которого входит культуральный антиген вируса РРСС.

Накопление, очистка и манипуляции с культуральным вирусом при разработке ИФА тест-систем требуют длительного времени, больших материальных затрат и вносят риск контаминации. Эта проблема решается заменой культурального вирусного антигена на рекомбинантный нуклеокапсидный белок N (rN) вируса РРСС, поскольку известно, что самый

ранний иммунный ответ в организме животного направлен именно на этот высоко иммуногенный белок [111].

В настоящее время разработано много различных тест-систем на основе рекомбинантного белка N, полученного и в бакуловирусной [65], и в прокариотической системах экспрессии [11, 64]. Существуют коммерческие наборы непрямого ИФА с применением рекомбинантного белка N вируса PRRS европейского и американского типов (Checkit PRRS, Dr.Bommeli AG, Bern, Switzerland).

Серологические методы диагностики могут осложняться антигенной вариабельностью штаммов. Однако показано, что нуклеокапсидный белок индуцирует выработку высоких титров антител у всех больных животных.

Наличие одних лишь клинических признаков заболевания недостаточно для постановки диагноза, из-за того, что сходные респираторные и репродуктивные симптомы могут быть вызваны вирусами гриппа и парвовируса свиней, болезни Ауески и энцефаломиокардита. Постановка диагноза серьезно осложняется наличием секундарных инфекций. Иногда PRRS может протекать бессимптомно. Одной из особенностей данного заболевания является широкое разнообразие клинических проявлений.

Вirus можно выделить из различных тканей и органов: костного мозга, селезенки, тимуса, миндалин, лимфоузлов, сердца, мозга, печени и почек. Однако наиболее подходящим и надежным объектом в данном случае являются сыворотка крови и альвеолярная жидкость. Автолитические процессы быстро инактивируют вирус. Поэтому выделение вируса часто осложняется из-за инактивации вируса во время длительного хранения, из-за нарушения условий отбора и хранения образцов и нечувствительности различных типов клеточных линий. Попытка выделить вирус на культуре клеток MARC-145 из образцов, хранившихся в течение более 4 лет при минус 80⁰С, оказалась неудачной, в то время как при помощи метода ПЦР РНК вируса обнаруживалась во всех образцах [79].

В лабораторной диагностике используют ряд серологических методов детекции вируса (иммунопероксидазный анализ, иммуноферментный анализ). При постановке иммунопероксидазного анализа необходимо инфицировать 30-50% макрофагов, чтобы были заметны четкие различия с неспецифическими сыворотками. Диагностика с использованием всех серологических тестов может осложняться из-за антигенной вариабельности штаммов. Также серодиагностика не всегда позволяет различить инфицированных свиней, вирусоносителей и переболевших иммунных животных [92].

Метод ПЦР применяют для обнаружения РНК вируса РРСС с 1988 г. [57]. ПЦР является одним из наиболее чувствительных и специфичных методов диагностики вируса РРСС в тканях, органах, биологических жидкостях и культуре клеток. Существуют несколько вариантов постановки данной реакции, их успешно используют для детекции вируса. Методом ПЦР можно выявить наличие вируса в крови уже на первый день после инфицирования животных внутривенным или назально-пероральным способом. Возможность дифференцирования американский и европейский тип ВРРСС между собой, а также обнаружение возбудителя РРСС в сперме животных, является существенным преимуществом метода ПЦР над всеми иммунологическими методами, ими этого сделать не возможно из-за наличия биологических ингибиторов [64]. Метод «гнездовой» ПЦР позволяет обнаруживать от 10 инфекционных частиц на 1 мл спермы, а также отличать вирус РРСС от родственных артеривирусов и прочих патогенов свиней. Кроме того он, при проверке смывов с носоглотки, оказался самым эффективным способом выявления носителей вируса РРСС, при том что серологический статус больных животных неотличим от статуса носителей заболевания.

Следует отметить, что метод ПЦР имеет высокую степень корреляции с серологическими методами, а по чувствительности не уступает выделению вируса на культуре альвеолярных макрофагов в момент острой фазы заболевания [12]. Метод ПЦР оказался более чувствительным, чем выделение на культуре клеток, при обнаружении вируса у переболевших свиней. Окончательный диагноз на

наличие ВРРСС ставят на основании результатов лабораторных исследований, включающих в себя выделение вируса на культуре клеток, обнаружение специфических антител методами МФА и ИФА, детекцию вирусной РНК методом ПЦР-анализа [5].

1.1.5. Иммуитет и специфическая профилактика

При выявлении заболевания проводят симптоматическое лечение с целью не допущения развития тяжелых признаков заболевания [18].

Предполагается, что выработка антител имеет лишь ограниченное протективное значение. Зараженные свиньи продолжают оставаться вируемичны на протяжении 4-6 недель после того, как была зафиксирована сероконверсия, и могут передавать вирус другим животным. Нет информации, защищают ли материнские антитела от инфицирования, однако у поросят, которые родились от серопозитивных свиноматок, вирусемия выявляется к 4 неделе [8]. Определенная степень защиты у поросят с материнскими антителами все же обнаруживается, и повышение титра нейтрализующих антител часто соответствует снижению титра вируса в крови. Более того, у свиней инфицированных повторно, уже не развиваются столь значительные нарушения функции репродукции. Срок жизни материнских антител 4-8 недель. Сывороточные антитела появляются в течение 14 дней, и их титр достигает максимума к 5-6 неделе после заражения. Нейтрализующие антитела могут быть обнаружены между 3 и 4 неделями после инфицирования. Многие животные становятся серонегативными через 4-6 месяцев.

Для предотвращения распространения заболевания проводят стандартный комплекс карантинно-санитарных мер, включающий в себя: серологический скрининг ввозимых животных, карантин и ограничения перемещений внутри, а также между стадами.

Антибиотики могут снижать или не снижать эффект от вторичной бактериальной инфекции, кроме того используют различную поддерживающую терапию. При возникновении репродуктивных проблем в стаде рекомендовано проведение искусственного осеменения.

Для оздоровления поголовья в стадах практикуют ранний отъем поросят. Хотя это и эффективно в случае многих патогенов, но не предотвращает передачи вируса от инфицированных свиноматок к потомству.

Вакцинация. На данный момент в мире доступны коммерческие варианты как живых, так и инаktivированных вакцин, также разрабатываются субъединичные вакцины против РРСС [66]. При использовании «убитой» вакцины снижается количество аборт, рождение ослабленных и мертворожденных поросят. Вакцинация влияет на такие параметры как длительность виремии, тяжесть поражения легких, а также интенсивность роста молодняка. Вакцинация предусматривает 2 кратное внутримышечное введение вакцины с интервалом в 21 день, booster-вакцинация рекомендуется во время лактации. Подобная схема вакцинации демонстрирует 70% защиту животных при экспериментальном заражении. По сравнению с «убитыми», аттенуированные вакцины индуцируют становление более длительного и напряженного иммунитета.

Однако, использование живых вакцин имеет некоторые недостатки, которые ограничивают их применение, например: такие вакцины не предотвращают реинфицирование и не позволяют проводить четкую грань между вакцинированными и инфицированными животными. Также имеется, теоретическая, вероятность их реверсии к дикому виду [91].

Иногда заболевание может вспыхнуть на вакцинированном поголовье, поэтому неясным остаётся, как долго животные остаются иммунными.

Для специфической профилактики РРСС в России используют бивалентную вакцину против РРСС и парвовирусной болезни, разработанную во ВНИИЗЖ, а также моно- и поливалентные вакцины производства ООО «Ветбиохим». В США запатентованы две живые вакцины (RespPRRS/Repro, Prime Pac), которые с 1994-1996 года используют для вакцинации поросят, ремонтных свинок и свиноматок. Обе эти вакцины разработаны на основе американского штамма MLV. При испытании вакцины RespPRRS/Repro и экспериментальных живых вакцин, в лабораторных и экспериментальных условиях, установлена длительная

персистенция вакцинного вируса в организме свиней, а также его передача невакцинированным животным и инфицирование плода. Было обнаружено, что данные вакцины предохраняют от развития клинических признаков, но не от самого инфицирования вирулентным штаммом вируса РРСС. При этом протективный иммунитет развивается в течение длительного периода времени. Была установлена передача вакцинного вируса неиммунизированным свиноматкам. Вакцинный штамм вируса был выделен из абортирванных плодов и сыворотки крови невакцинированных животных.

Супоросных свиноматок, а также хряков-производителей не вакцинируют живыми вакцинами. В условиях экспериментального заражения хряков было выявлено выделение вируса со спермой, а также снижение её качества. При этом выделения вируса дикого типа со спермой после его введения вакцинированным хрякам, обнаружено не было [41].

В Нидерландах создана живая вакцина на основе природного низковирулентного штамма «Porcillis PRRS», помимо этого, в Испании и Франции выпускаются инактивированные вакцины. Все они прошли испытание в производственных условиях на свиноматках и поросятах, в ходе которых показали хорошие результаты.

Специфическую профилактику РРСС в США осложняет наличие атипичных штаммов вируса, которые вызывают более тяжелое течение заболевания и аборт у 15-60% свиноматок. В США имеется ДНК-вакцина, вызывающая активацию иммунного ответа на гуморальном и клеточном уровнях.

ДНК-иммунизация плазмидой, в состав которой входила последовательность нуклеотидов ORF-5 (кодирующую главный оболочечный гликопротеин вируса РРСС) под контролем промотора цитомегаловируса человека, вызвала образование анти-GP5-специфических нейтрализующих антител у свиней и мышей линии BALB/c. После интратрахеального заражения вакцинированных свиней было выявлено, что ДНК-вакцинация защищает от генерализованной виремии и развития типичных поражений легочной ткани, которые наблюдались в контрольной группе. Проявления интерстициальной

пневмонии и бронхоальвеолитов были значительно более умеренными, что говорит о возможности использования GP5 как субъединичной вакцины [8].

В США проводились исследования эффективности вакцин против ВРРСС, которые состояли либо из одного штамма, либо из 5 аттенуированных штаммов (мультиштаммовые). И та и другая вакцины вывали формирование протективного иммунитета, однако введения мультиштаммовой вакцины вызывало увеличение лимфатических узлов у подопытных поросят, и соответственно вставал вопрос о ее безопасности.

1.2. Цирковиральные болезни свиней

Цирковиральная болезнь свиней (ЦВБС) - это совокупность заболеваний, вызванных ЦВС-2. До сих пор остаются невыясненными вопросы связанные с переносом, патогенезом, эпидемиологией и контролем факторов риска, вовлеченных в распространение цирковиральных болезней свиней, таких как: синдром послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ), синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС), респираторные нарушения свиней (РНС), а также случаи расстройства репродуктивной функции свиней (РРФС) связанные с ЦВС-2 [93].

Цирковирус свиней первого типа (ЦВС-1) впервые был идентифицирован в 1974 году в качестве контаминанта перевиваемой культуры клеток почек поросят РК-15 и не признан болезнетворным агентом. На протяжении длительного времени ЦВБС выявляли у поголовья свиней, не проявляющих явных клинических признаков цирковирозов.

В 1991 г. в Канаде появились сообщения о случаях необычного заболевания 5-12-ти недельных поросят с высоким процентом смертельных случаев. Болезнь была названа «синдромом послеотъемного мультисистемного истощения» [62].

В момент вспышки этого заболевания в 1997 г. был изолирован новый вирус - цирковирус свиней второго типа (ЦВС-2), который был признан этиологическим агентом СПМИ. Ретроспективные серологические исследования доказали, что ЦВС-2 уже длительное время циркулировал в свиноводческих

хозяйствах: Бельгии с 1969 г., Великобритании - 1970 г., Северной Ирландии - 1973 г., Канаде и США - 1985 г [5].

В настоящее время заболевание распространилось практически повсеместно и вызывает серьезные экономические проблемы в свиноводческих хозяйствах всего мира [93].

1.2.1. Характеристика возбудителя

Возбудителем цирковиральных болезней свиней (ЦВБС) является ЦВС-2. Он, так же как и ЦВС-1, относится к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae*. Международный комитет по таксономии вирусов в 1995 году выделил цирковирусы в отдельное семейство, включающее, помимо ЦВС, также вирус болезни пера и клюва попугайных, вирус анемии цыплят, цирковирусы попугаев, голубей, канареек и гусей. ЦВС-2 – это мелкий, безоболочечный, икосаэдрической формы вирус, содержащий замкнутую односпиральную геномную ДНК размером 1767-1768 нуклеотидов. Вирионы цирковирусов имеют диаметр 16-21 нм, не обладают гемагглютинирующей активностью, не содержат липидов и углеводов, стабильны в кислой среде (pH=3,0), устойчивы к обработке хлороформом и сохраняют инфекционность без изменений, при температуре 70 °C в течение 15 минут. Капсид состоит из 32 капсомеров [71]. Плавучая плотность в хлористом цезии составляет 1,36-1,37 г/мл, коэффициент седиментации 57S [104].

Геномная последовательность изолятов ЦВС-2 содержит 1768 нуклеотидов. Она на 9 нуклеотидов длиннее последовательности ЦВС-1. Гомология между ДНК молекулами ЦВС-1 и ЦВС-2 составляет порядка 80%. Все выделенные в различных странах мира штаммы ЦВС-2 имеют близкое антигенное и геномное родство. Идентичность их нуклеотидных последовательностей составляет порядка 94% [27].

Репликативная форма генома ЦВС содержит две противоположно ориентированные открытые рамки считывания (ORF) и несколько минорных ORF. Ген ORF1 обоих типов вируса кодирует белки, необходимые для репликации вируса. ORF1 ЦВС-1 содержит 936 нуклеотидов и кодирует белок размером 312 аминокислот, ORF1 ЦВС-2 содержит 942 нуклеотида и кодирует

белок размером 314 аминокислот. Гомология по нуклеотидам между ORF1 двух типов вируса составляет 83%, по соответствующим аминокислотам – 86 % [88]. Ген ORF2 обоих типов цирковируса содержит 699 нуклеотидов, кодирует белок в 233 аминокислоты и более вариабелен, чем ORF1. Гомология по нуклеотидной последовательности составляет 67%, а по аминокислотной – 65%. Между ORF1 и ORF2 расположены два некодирующих участка (83 и 44 нуклеотида, соответственно).

Гомология ДНК у выделенных в Европе штаммов ЦВС-2 составляет 99,8%, в Северной Америке – 99,5%. На нуклеотидном уровне, гомологичность всех выделенных штаммов цирковирусов составляет менее 80% [23, 85].

ЦВС-2 делится, на основании различий в последовательности нуклеотидов в области ORF2, на ЦВС-2а, b, c, d [25, 93]. Тяжесть, с которой протекает ЦВС-2 в последнее время, многие исследователи связывают с переходом от ЦВС-2а к ЦВС-2b инфекции. Филогенетический анализ последовательностей ДНК ЦВС-1 и ЦВС-2, полученных из разных географических областей, выявил наличие генотипов популяции ЦВС-2, циркуляция которых характерна исключительно для конкретного региона. Например, Cheung et al. была выявлена популяция ЦВС-2, циркулирующая исключительно в США и Канаде, и существенно отличающаяся от всех других имеющихся изолятов [60].

ЦВС-2d впервые был выявлен в ходе ретроспективных исследований сыворотки крови свиней, полученных из Швейцарии в 1998 году. ЦВС-2d также разделяется на подтипы ЦВС-2d-1 и ЦВС-2d-2. В настоящее время подтверждено наличие ЦВС-2d в Азии и в Великобритании [112].

Известно, что ORF2 цирковируса кодирует главный структурный капсидный белок ЦВС-2, который, теоретически, может содержать разное число сайтов для посттрансляционной модификации: фосфорилирования, сульфатирования, метилирования, ацетилирования или гидроксирования, и имеет молекулярную массу 28 kDa и более [85, 88].

Nawagitgul, P. с соавторами синтезировали в клетках насекомых рекомбинантный капсидный белок с молекулярной массой примерно 30 kDa и

показали, что он вовлечен в формирование вирусного капсида: при самосборке из этого белка формируются вирусоподобные частицы, сходные с интактными цирковирусами [89]. Эти данные соответствуют сообщениям о других безоболочечных вирусах.

К ЦВС-1 чувствительны первичная и перевиваемая культура клеток почки поросенка (РК-15) и линия клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero), в которых он размножается без развития цитопатического действия (ЦПД) и накапливается в титре 3,5—4,8 lg ТИД₅₀/мл. ЦВС-2 также реплицируются в клетках РК-15 без цитопатического действия, и накапливается в титре 4,3—5,5 lg ТИД₅₀/мл. У иммуностимулированных адьювантом Фрейнда поросят, ЦВС-2 накапливается в лимфоидной ткани в титре 7—8 lg ТИД₅₀/гр ткани.

Выделенный в клетках РК-15 ЦВС-1 реплицируется более интенсивно, чем патогенный ЦВС-2. Цирковир свиней первого типа, в клетках РК-15, является персистентным и постепенно усиливается с каждым новым пассажем.

Антигены ЦВС-1 и ЦВС-2 обычно выявляют в ядре инфицированных клеток. Однако, с развитием инфекции антиген ЦВС может выявляться также в цитоплазме.

Показано, что репликация ЦВС-1 в клетках РК-15 существенно увеличивается при культивировании инфицированных клеток в присутствии 300 мМ глюкозамина, при этом на 30% увеличивается количество инфицированных клеток. В последнее время для размножения ЦВС-2, используют перевиваемую культуру клеток сетчатки плода свиньи, трансформированную геном Е1 аденовируса человека [84].

1.2.2. Патогенез

Механизм патогенеза цирковирозов изучен мало [43]. Вирус, вероятно, нарушает функцию иммунной системы. Доказано, что ЦВС-2 присутствует в моноцитах, макрофагах и дендритных фолликулярных клетках, но не реплицируется в них. Полагают, что ЦВС-2 может пользоваться фагоцитной и фузогенной природой макрофагов для распространения от клетки к клетке. Инфицированные моноциты могут функционировать как транспортное средство,

способствующее распространению вируса в теле животного и инфицированию лимфоидных органов и тканей, что приводит к недоступности ЦВС-2 специфичным антителам [34].

Лимфоцитопения лимфоидных органов не является следствием прямого цитопатического действия ЦВС-2, поскольку вирус не реплицируется в лимфоцитах [80]. Однако лимфоцитопения и лейкопения являются признаком гистопатологических повреждений, обнаруживаемых как у субклинически инфицированных ЦВС-2, так и у больных СПМИ поросят. Вероятно, ЦВС-2 вызывает лимфоцитопению не из-за апоптоза, а в значительной степени из-за снижения пролиферации лимфоцитов, что способствует деградации иммунной системы поросят и возникновению СПМИ.

В естественных условиях поросята нередко являются дополнительно инфицированными различными вирусами, способствующими размножению ЦВС-2 в организме. Так в хозяйствах США 60% поросят, у которых выявлялось наличие СПМИ, поражены наряду с ЦВС-2 также и ВРРСС. Примерно у 20% поросят с СПМИ обнаруживалось и ЦВС-2 и парвовирус свиней. В экспериментальных условиях выяснено, что наряду с полевыми изолятами ВРРСС, также и живая вакцина от РРСС, усиливают размножение ЦВС-2 в организме поросят [4, 42].

О вовлечении в патогенез цирковирозов, помимо ЦВС-2 и ВРРСС, также сообщил Allan et al., в 2000 году. Вирус РРСС обнаружен в большом количестве полевых образцов от поросят с признаками ЦВБС в США. Наиболее убедительным лабораторным подтверждением вирусного взаимодействия, приводящего к отягощению заболевания, являются результаты одновременного экспериментального инфицирования поросят ВРРСС и ЦВС-2. Так у поросят, инфицированных двумя вирусами, обнаружены более сильно выраженные клинические симптомы и повреждения, характерные для ЦВБС, чем у поросят, пораженных лишь одним ЦВС-2. Кроме того, одновременное инфицирование ВРРСС и ЦВС-2 существенно повысило смертность поросят [42].

В экспериментальных условиях СПМИ развивается лишь у малой части поросят-гнутобиотов, безмолозивных и обычных поросят, инфицированных только ЦВС-2. Одновременное инфицирование поросят ЦВС-2 и другими патогенами (парвовирусом свиней, ВРРСС, ВГС, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*) увеличивает частоту и тяжесть проявления заболевания, а также приводит к развитию клинических признаков болезни и зачастую к гибели поросят. Из этого можно сделать вывод что, для усиления размножения и распространения ЦВС-2 в организме поросят необходимы «дополнительные факторы». Ускорение размножения ЦВС-2 происходит также в следствии активации иммунной системы при помощи иммуностимуляторов или введением каких бы то ни было вакцин [40]. У иммуностимулированных поросят ЦВС-2 может накапливаться в лимфатических узлах, селезенке и печени, в сотни раз больших количествах, чем у неиммуностимулированных поросят. Активация иммунной системы сопровождается размножением макрофагов, Т и В-лимфоцитов, которые и являются клетками-мишенями для ЦВС-2. Вирус размножается в делящихся клетках и для этого требуются клеточные ДНК-полимеразы, которые синтезируются в S-фазе клеточного цикла [27, 40].

Полагают, что мыши могут быть резервуаром ЦВС-2, поскольку у них были обнаружены антитела к ЦВС-2. Однако картина патогенеза ЦВС-2 у мышей до конца не ясна: после внутрибрюшинного и интраназального заражения у них нет развития клинических признаков и макроскопических поражений.

При ЦВБС трупы животных истощены, кожа белого или желтого цвета. Большинство лимфатических узлов увеличены в 3-5 раз, на разрезе сочные, белого цвета. Легкие плотные, с красными участками, мясистой консистенции. Почки увеличены, бледные, с кровоизлияниями в корковом слое, иногда на их поверхности регистрируют небольшие «ямки» и мелкие белые очаги. Печень нормального размера, имеет пестрый мозаичный вид (на коричневом фоне распложены участки желтоватого цвета). Селезенка несколько увеличена, мясистой консистенции [23].

Гистологически отмечают гранулематозное воспаление, и уменьшение количества лимфоцитов в лимфоидных органах, интерстициальную пневмонию. Иногда наблюдают системный некротизирующий васкулит (воспаление стенок капилляров, венул и артерий), некротизирующий и экссудативный гломерулит (воспаление почечных клубочков) и интерстициальный нефрит [27]. В макрофагах из воспалительных очагов регистрируют округлые разного размера базофильные тельца-включения, которые представляют собой скопления ЦВС-2. Иногда отмечают гепатит, панкреатит, гастрит, энтероколит и миокардит.

Синдром послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ) впервые был зарегистрирован в Канаде в 1991 г. у поросят в период дорастивания. СПМИ обычно наблюдают у поросят через 3-4 недели после отъема. В естественных условиях клинические признаки болезни очень разнообразны, основными из них являются отставание в росте и истощение. Другие признаки болезни (одышка, увеличение паховых лимфатических узлов, диарея, бледность и желтушность слизистых оболочек и кожи) развиваются с различной степенью интенсивности [46, 77]. Иногда отмечают кашель, лихорадку, атаксию, парез конечностей и внезапную гибель поросят [83]. Часто нечеткая выраженность этих симптомов ведет к постановке ошибочного диагноза. В хозяйствах, в период обострения болезни, гибель поросят возрастает в 3-4 раза. В естественных условиях СПМИ отмечают у 2-4 месячных поросят, при вспышке заболевания поражается примерно 20—40 % поросят 8—13-недельного возраста, причем в среднем 70-80% поросят погибают от болезни или подвергаются эвтанации. Частота и тяжесть болезни зависят от численности свиней в хозяйстве, их иммунного статуса и технологии производства. СПМИ чаще развивается у поросят, имеющих при рождении низкую массу тела [27, 40].

На практике СПМИ зачастую сочетается с синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС), респираторными нарушениями свиней (РНС) и с расстройством репродуктивной функции свиней (РРФС) [4, 40, 93].

Патогенез СПМИ изучен недостаточно. После проникновения в организм поросят, ЦВС-2 начинает интенсивно размножаться в клетках лимфоидной ткани,

что приводит к их гибели и развитию иммунодефицитного состояния. У таких животных возникают вторичные инфекции, вызываемые условно патогенными микробами [27].

При вскрытии павших свиней обнаруживают увеличенные в несколько раз лимфатические узлы, пневмонию, гепатит и нефрит, на селезенке отмечают инфаркты, в желудке язвы. Гистологически выявляют интенсивное разрушение лимфоцитов в лимфоидных органах - тимусе, селезенке, лимфоузлах [27, 42].

Синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС) впервые был описан английскими исследователями в 1993 г. Заболеваемость составляет от 0,5% до 20%, у поросят 5—16-недельного возраста отмечается угнетенное состояние, лихорадка, потеря аппетита, прострация, отек подкожной ткани в области живота, некротические поражения кожи на задних конечностях и в области промежности, кровоизлияния в коже. Зачастую СДНС сопровождается интерстициальной грануломатозной пневмонией, что приводит к истощению лимфоцитов, гепатитам, нефритам и панкреатитам. Летальность может составлять более 80 %, но в то же время, поросята могут спонтанно выздоравливать без всякого лечения. При посмертном исследовании обнаруживают бледные, увеличенные, иногда геморрагичные почки, в селезенке выявляют множественные инфаркты. В острой фазе проявления СДНС могут быть идентичны таковым при классической чуме свиней. Синдром не воспроизведен экспериментально, но ученые указывают на важную роль ЦВС-2 в развитии этой патологии.

Заболевание нередко отягощается одновременным инфицированием свиней другими патогенами, как вирусной, так и бактериальной этиологии, что приводит к продолжительным и необычно тяжелым вспышкам комплекса респираторных заболеваний. Эти вспышки практически не отвечают на антимикробную терапию и могут привести к групповой смерти животных, превышающей обычную в 2-10 раз.

Респираторные нарушения свиней (РНС). В большинстве случаев (76-88%) в легких свиней выявляют два и более патогенов. Основными причинами респираторных нарушений свиней помимо ЦВС-2 являются: ВРРСС, *Mycoplasma*

hyopneumoniae, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*. Еще раз отмечаем, что наиболее часто в пораженных легких обнаруживают ЦВС-2 (18-65%), вирус РРСС (12-42%), *Pasteurella multocida* (22-51%), *Mycoplasma hyopneumoniae* (14-51%). ЦВС-2 наиболее интенсивно, относительно других вирусных патогенов, размножается в легких и поражает в 3 раза больше клеток, чем, например, ВРРСС. Последний, усиливает размножение ЦВС-2 [27]. Антиген ЦВС-2 в большом количестве обнаруживают в эпителиальных клетках бронхиол и альвеолярных макрофагах, тогда как вирус РРСС - только в макрофагах и в значительно меньшем количестве. Полагают, что в развитии пролиферативной и некротической пневмонии свиней основную роль играют ЦВС-2 и ВРРСС. В отличие от СПМИ лимфоидная ткань при респираторных болезнях не поражается [4, 40].

Расстройства репродуктивной функции свиней (РРФС). Этот синдром впервые был зарегистрирован в Канаде в 1999 г. ЦВС-2 проникает через плаценту свиноматок и вызывает гибель эмбрионов и плодов. Он вызывает аборт во второй половине беременности, рождение мертвых и слабых поросят. ЦВС-2 также поражает хряков и может выделяться со спермой в течение длительного времени. В естественных условиях более 90% свиноматок содержат специфические антитела, однако репродуктивные нарушения обусловленные ЦВС-2, встречаются относительно редко [5, 27].

У мертворожденных поросят обнаруживают гипертрофию сердца, а так же застойную гиперемии печени. В миокарде выявляют множественные некротические участки белого цвета. Гистологически наблюдают фиброзный и некротический миокардит. В миокарде плодов и мертворожденных поросят содержится большое количество антигена ЦВС-2, что свидетельствует об интенсивном размножении вируса в быстро делящихся клетках сердца [27, 42].

1.2.3. Эпизоотологические данные

Цирковиром как первого, так и второго типов получил повсеместное распространение во всех регионах мира с развитым промышленным свиноводством. ЦВС-2 присутствовал в популяции свиней на протяжении

длительного времени, но редко являлся причиной СПМИ. Тот факт, что СПМИ оставался не выявленным вплоть до 1991 года, может быть объяснен неспецифическими клиническими признаками этого заболевания и повсеместным распространением инфекционных агентов разной этиологии, как вирусной, так и бактериальной.

В связи с частым отсутствием клинических проявлений заболевания, в том числе и в неблагополучных хозяйствах, распространенность ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах оценивают по обнаружению специфических антител в сыворотке крови свиней, а так же по выявлению вируса или вирусного антигена в органах и тканях поросят [40]. В последние годы отмечается тенденция к увеличению широты распространенности ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах [16]. Так серологические исследования проведенные в ряде стран с развитым свиноводством (Бельгия, Испания, Великобритания, Канада, США), выявили наличие антител к ЦВС-2 у 80-95% свиноматок и молодняка на откорме, независимо от наличия или отсутствия в хозяйствах СПМИ, СДНС, РНС или РРФ [40, 81]. При исследовании сыворотки крови 11-17 недельных поросят (период дорастивания) в хозяйствах с СПМИ, серопозитивные к ЦВС-2 животные выявлены в 90-95% случаев, в то время как в хозяйствах без СПМИ количество положительно реагирующих животных было существенно ниже и составляло 53-54% [27, 93]. Колостральный иммунитет обычно сохраняется у поросят до 5-14-недельного возраста. Однако есть данные, что у поросят в хозяйствах без СПМИ материнские антитела к ЦВС-2 сохраняются более длительный период времени, чем у поросят в хозяйствах с СПМИ [82].

Естественное инфицирование поросят ЦВС-2 в хозяйствах с СПМИ происходит в более раннем возрасте, чем инфицирование поросят в хозяйствах без СПМИ. Во втором случае, не развиваются клинические признаки болезни, а инфицирование сопровождается лишь иммунным ответом. По всей видимости, с увеличением возраста поросят возрастает и их резистентность к заражению ЦВС-2. В сыворотке крови клинически больных поросят вирусной ДНК содержится больше, чем в сыворотке клинически здоровых поросят. Не обнаружено различий

в штаммах ЦВС-2, выделенных от клинически больных и здоровых поросят [4, 27].

Источником возбудителя инфекции являются больные и латентно инфицированные свиньи разных возрастных групп, они выделяют ЦВС-2 с фекалиями, мочой, слюной, молоком, носовыми и глазными секретами. При прямом контакте инфицированных поросят с серонегативными, вирус передаётся через 42 суток после заражения первых. Наиболее длительную персистенцию вируса (52-125 суток) отмечают в селезенке, печени, тимусе и лимфоузлах [40]. Установлено, что, ЦВС-2 выделяется со спермой в течение 47 суток после интраназального заражения хряков. Хряки старше 1,5 лет вирус со спермой не выделяют [4, 78].

Следует отметить, что свиньи в дикой природе также подвержены инфицированию ЦВС-2, количество положительно реагирующих животных колеблется от 33 до 89% [5, 52].

1.2.4. Лабораторная диагностика

Диагностика цирковироза у свиней является комплексной и включает оценку эпизоотического состояния хозяйства и региона в целом, визуальный осмотр поголовья животных и методы лабораторной диагностики. При этом проводят и дифференциальную диагностику цирковирозов от болезней вирусной и бактериальной этиологии, таких как респираторно-репродуктивный синдром свиней, классическая чума свиней, африканская чума свиней, болезнь Ауески, лептоспироз, гемофилезная (актинобациллёзная) плевропневмония, пневмонии, вызванные: хламидиями, микоплазмами, сальмонеллами, стрептококками и других заболеваний, приводящих к истощению поросят.

Наиболее важным инструментом при постановке диагноза ЦВБС, является выявление гистопатологии с детекцией ЦВС-2 [45, 102]. Наиболее часто используют иммуногистохимию (ИГХ), которая позволяет выявлять вирусный антиген, и *in situ* гибридизацию (ISH), дающую возможность детектировать нуклеиновую кислоту ЦВС-2. Рядом авторов отмечено наличие достоверной

корреляции между микроскопическими повреждениями в лимфоидных тканях и количеством ЦВС-2, обнаруженного в них.

Сочетание гистологических исследований и детекции ЦВС-2 в тканях методами ИГХ и ISH является «золотым стандартом» при диагностике СПМИ. Количественный метод ПЦР позволяет определить вирусную нагрузку, а также используется для диагностики этого заболевания. Методом ПЦР показано, что в крови клинически больных поросят содержится в количественном плане больше антигена ЦВС-2, чем в крови клинически здоровых. При этом ЦВС-2 обнаруживают и в крови 50% клинически здоровых животных. Таким образом, следует сделать акцент на том, что количественная оценка наличия ЦВС-2 является определяющей для дифференциации пораженных свиней и субклинически инфицированных ЦВС-2 животных.

Однако, в связи с тем, что ЦВС-2 широко распространен в свиноводческих хозяйствах у животных как с клиническими признаками цирковироза, так без них, применение только ПЦР для диагностики этого заболевания не является достаточным. Возникает необходимость использования других методов исследования, например серологических, основанных на обнаружении специфических антител у тестируемого поголовья, например: метод непрямой иммунофлуоресценции (МНИ), иммунопероксидазное окрашивание содержащего вирус клеточного монослоя и различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [50]. Также существуют и другие методы детекции ЦВС-2, таких как выделение вируса из культуры клеток и реакция нейтрализации, но по причине их трудоёмкости их чаще используют для исследовательских целей, чем для рутинной диагностики.

1.2.5. Иммунитет и специфическая профилактика

Эффективность вакцинации против ЦВС-2 сомнений не вызывает [38]. Для специфической профилактики цирковирозов существует ряд субъединичных вакцин, основанных на использовании рекомбинантного капсидного белка ЦВС-2 в качестве антигена. Он способен вызвать защитный иммунный ответ на контрольное заражение диким типом ЦВС-2 [77, 97]. Фирма «Merial» разработала

против ЦВС-2 инактивированную вакцину «Цирковак», предназначенную для свиноматок и ремонтных свинок (Дрю, 2006). Вакцина в течение полутора лет использовалась во Франции и Германии, где были получены обнадеживающие результаты [21]. Специалистами ООО «Ветбиохим» разработана, успешно прошла широкие производственные испытания, зарегистрирована в установленном порядке и на протяжении нескольких лет широко применяется в нашей стране рекомбинантная субъединичная вакцина против цирковирусной болезни свиней «ВЕРРЕС-ЦИРКО». Вакцина предназначена для иммунизации поросят, начиная с 2 недельного возраста, а также ремонтных свинок, свиноматок и хряков – производителей [36, 37].

Лечение больных поросят не эффективно. В свиноводческих хозяйствах, свободных от ЦВС-2, профилактика основывается на строгом соблюдении ветеринарно-санитарных правил и предупреждении заноса возбудителя инфекции. В неблагополучных хозяйствах основным является выполнение всех необходимых противозoonотических мероприятий, а также обеспечение нормального физиологического статуса и высокой резистентности организма свиней.

В литературе были сообщения о том, что достичь уменьшения частоты появления СПМИ в неблагополучных хозяйствах возможно при соблюдении общих ветеринарно-санитарных мероприятий, включая, улучшение гигиены, ограничение до минимума смешения возрастных групп животных, улучшения качества воздуха и быстрой изоляцией больных животных, а также снижением уровня стресса в стаде.

Первоначально считали, что основной причиной появления СПМИ в незараженных хозяйствах является приток новых инфицированных свиней. Однако даже при строго изолированном вскармливании поросят через 2 года в хозяйстве возникал СМПИ [99].

Снизить потери от ЦВБС в стадах можно применением сывороточной терапии [110]. Однако следует отметить, что эта процедура является дорогостоящей и трудоемкой, так как требует определения уровня антител у

достаточно большого поголовья свиней, сбора иммунной к ЦВС-2 сыворотки у более взрослых свиней с последующим введением её молодым животным, что опять же трудоёмко и небезопасно, так как повышает риск повторного заноса патогенных агентов в стадо.

Были предприняты неоднократные попытки удалить ЦВС-2 из хозяйств депопуляцией поголовья, которые, однако, не увенчались успехом, так как цирковирозы вновь возникали при поступлении в хозяйство новых животных [99]. Вероятно, это связано с тем, что ЦВС-2 по своей природе является устойчивым ко многим дезинфектантам и повсеместно присутствует в популяции свиней. Это возлагает дополнительные требования при проведении дезинфекции как в благополучных, так и неблагополучных хозяйствах.

В хозяйствах промышленного типа рекомендовано заменить трехфазную систему выращивания свиней на двухфазную. При такой системе поросят после отъема оставляют в станках для опороса, а в 3 - 4 - месячном возрасте переводят в помещение для откорма. В небольших свиноводческих хозяйствах необходимо проводить туровые опоросы, при этом разрыв между ними должен быть не менее 3 мес. Однако, соблюдение данных рекомендаций вызывает дополнительные трудности [5].

1.3. Грипп свиней

Грипп свиней (ГС) (инфлюэнца свиней, энзоотическая бронхопневмония) — высоко контагиозное, остро протекающее заболевание, характеризующееся внезапным началом, резко выраженной лихорадкой, общей слабостью, поражением органов дыхания и абортами у свиней [46]. Гриппом болеют свиньи всех возрастов и пород, однако наиболее восприимчивы поросята 15-50 - дневного возраста. Грипп свиней не имеет строгой сезонности, но обычно вспышки происходят в холодное время года, особенно часто они случаются у свиней содержащихся в помещениях с неудовлетворительным микроклиматом. Инкубационный период заболевания составляет обычно 1-6 суток. ВГС может

вызывать заболевание людей, и наоборот, возможно заражение свиней вирусом гриппа человека [39].

Болезнь впервые была зарегистрирована в США в 1918 г. во время пандемии гриппа человека. Повторные вспышки заболевания сначала связывали с гемофилезом свиней, и лишь в 1931 г. Шоп и Льюис установили, что возбудителем является вирус, имеющий антигенное и иммунобиологическое родство с возбудителем гриппа человека. Он был обозначен как А/Айова/15/31. Вирус гриппа свиней может вызвать заболевание людей. Доказана возможность заражения свиней вирусом гриппа человека [5].

Болезнь регистрируют во всех странах Европы, Америки и Азии, в том числе и на территории РФ. В отдельных хозяйствах грипп свиней причиняет существенный экономический ущерб — в результате заболевания, почти вдвое сокращается количество нормальных опоросов, а также резко уменьшается число поросят в помете [46].

Наиболее распространенными штаммами вируса гриппа являются: H1N1, H1N2 и H3N2 [50].

Несмотря на широкую распространённость и высокую контагиозность заболевания, в России в настоящее время, ВГС остается малоизученным. Вследствие особенностей генома вируса гриппа, ему свойственна чрезвычайно высокая изменчивость, и возможность реассортации, способной приводить к возникновению новых антигенных вариантов вируса, потенциально опасных для человека [19].

1.3.1. Характеристика возбудителя

Возбудитель - гемагглютинирующий, оболочечный вирус, размером около 70-120 нм из рода Orthomyxovirus, семейства Orthomyxoviridae [46, 69]. Геном представлен одноцепочечной сегментированной антисмысловой молекулой РНК. Семейство Orthomyxoviridae включает в себя 3 серотипа: А, В и С, принадлежность определенного штамма вируса к тому или иному серотипу зависит от свойств его внутренних белков М1 и NP, а также количества РНК-сегментов и структуры кодирования ими вирусных белков. Вирион ВГС типа А

имеет диаметр 80-120 нм, и обладает сферической либо овальной формой [15]. Он состоит из фрагментированного нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеиновой оболочки, представляющей собой центрально расположенный двойной липидный слой, окруженный снаружи и изнутри белками. Белки наружного слоя образуют порядка 500 пепломеров, радиально обрамляющих вирион и выступающих на 10-14 нм. над поверхностью липидной оболочки. Вирионы содержат 1-2% РНК, 5-8% углеводов, 20% липидов и 70% белка. Липиды оболочки происходят из липидов плазматической мембраны клеток [41].

Геном вируса составляет порядка 10-14,5 тысяч нуклеотидов, и состоит из 8 фрагментов (размером от 874 до 2396 нуклеотидов), на 3'-конце которых находятся 20-45 некодирующих нуклеотидов, а на 5'-конце 23-61 нуклеотида, в зависимости от фрагмента. Подавляющее большинство случаев поражения ВГС обусловлены штаммом H1N1, на втором месте по частоте выявления стоит штамм H3N2 [9, 40].

Классификация различных подтипов ВГС типа А основана на различиях антигенной структуры поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). В настоящее время известно 18 типов НА и 9 типов НА [22, 105], из них лишь 13, входящих в состав вируса гриппа свиней [72, 108].

Функции НА: геммагглютинирующая активность вируса, прикрепление вирионов к клеткам – мишеням, слияние вирусной и клеточной мембран.

Известно, что различные по структуре НА могут обладать 2 различными способами к распознаванию и связыванию с рецептором – сиаловой кислотой, которая связана в олигосахаридах клеточных мембран с галактозой.

Для ВГС характерны оба типа связи, что, по мнению специалистов, ещё раз подтверждает роль свиньи в качестве промежуточного хозяина в цепи передачи вируса гриппа между птицами и человеком. Именно в организме свиньи могут встретиться штаммы вирусов птицы и человека, и произойти одновременная репликация, и появление нового «межвидового» вируса, существенно отличающегося от исходных штаммов [13, 63]. Установлено, что дивергенция между свиными и человеческими вирусами произошла в период вспышки болезни

1905 г. [39]. В организме супоросной свиньи, вирус может проникать через плаценту к плоду, что в некоторых случаях приводит к его гибели.

Возбудитель гриппа малоустойчив к физическим и химическим воздействиям. При температуре 60 °С инактивируется за 20 мин, при 18-22 °С жизнеспособен до 6 суток, при 2-4 °С — от 20 суток до 3 месяцев. Низкие температуры консервируют вирус — при минус 20 – минус 70 °С он может храниться несколько месяцев, в лиофилизированном виде под вакуумом – в течение 3,5-4 лет. Вирус высокочувствителен к кислой и щелочной реакции среды (оптимальный pH для хранения составляет 7,0-7,2) [75]. Растворы хлорамина, хлорной извести, формальдегида, фенола, в принятых для дезинфекции концентрациях, вызывают гибель вируса в течение 5-10 минут.

Вирус репродуцируется в куриных эмбрионах (КЭ), не приводя к их гибели, в организме мышей, хорьков, а также в различных культурах клеток (КК), вызывая в них цитопатический эффект. Репродукция вируса возможна в культуре клеток почки телёнка, хомяка, мыши, обезьяны, поросёнка и лёгких эмбриона свиньи [46]. Вирус приобретает цитопатогенные и гемагглютинирующие свойства и накапливается в титрах 10^5 - 10^6 ЭИД₅₀/мл и 10^6 ТЦД₅₀/мл. Адаптированные к КЭ штаммы вызывают появление на ХАО беловатых точечных фокусов. При заражении КЭ в аллантаисную полость на теле зародыша появляются гемморагии. Для культивирования используют 10-11 дневные КЭ. Максимальное накопление вируса происходит через 48-72 часа, его титр в амниотической или аллантаисной жидкости достигает 10^7 - 10^8 ЭИД₅₀/мл [5]. Из лабораторных животных к вирусу наиболее чувствительны белые мыши, крысы, хорьки и хомяки при интраназальном заражении.

1.3.2. Патогенез

Вирус гриппа, попав на слизистые оболочки верхних дыхательных путей в виде капельного или пылевого аэрозоля, и обладая выраженным тропизмом к эпителиальным клеткам, репродуцируется в них и вызывает дегенерацию. Погибшие и пораженные эпителиальные клетки представляют собой хорошую питательную среду для микрофлоры, особенно патогенной, обитающей на

слизистой оболочке органов дыхания. Наиболее благоприятная среда создается для развития гемофильных бактерий (*Haemophilus influenza*) [5].

В результате воздействия вируса, бактерий и их токсинов повышается проницаемость капилляров, развивается септико-токсический процесс, с присущими ему клиническими проявлениями. Одновременно, иммунокомпетентная система обеспечивает выработку вируснейтрализующих, антитоксических и антибактериальных антител, которые защищают организм от интенсивных разрушительных процессов. Максимальный уровень антител в сыворотке крови заболевших свиней наблюдается на 14-21 день после заражения [19].

При патологоанатомических исследованиях основанные изменения обнаруживаются в легких и верхних дыхательных путях: на слизистой оболочке носовой полости - пенистая слизь красноватого цвета; в просвете бронхов - слизистые пробки; в легких - пневмонические очаги катарального характера; в грудной и носовой полостях, бронхах, трахеи – экссудат; увеличение, отечность и гиперемия бронхиальных и средостенных лимфоузлов. Иногда могут развиваться односторонние или двусторонние плевриты [19, 39].

1.3.3. Эпизоотологические данные

Источник возбудителя инфекции — больные свиньи и свиньи вирусоносители. Они выделяют вирус в больших количествах с истечениями из носа, при чиханье и кашле. Здоровые животные заражаются аэрогенно. Причиной заноса инфекции может быть обслуживающий персонал, больные животные или птицы. Легочные гельминты (*Metastrongilus elangatus*, *Chacrostongilus punderoectus*) являются резервуаром возбудителя инфекции, они выделяют инфицированные вирусом гриппа яйца во внешнюю среду. Последние заглатываются дождевыми червями, в организме которых вирус может сохраняться до 19 месяцев, и в этих случаях свиньи заражаются при поедании дождевых червей. Носителями вируса могут быть и грызуны. Факторами передачи возбудителя инфекции служат все объекты внешней среды, загрязненные вируссодержащими выделениями больных животных, откуда они в

виде капельного или пылевого аэрозоля попадают в дыхательные пути здоровых свиней.

В 1919 году Косен впервые описал межвидовую передачу вируса гриппа человека и животных. Грипп у свиней проявляется в виде эпизоотических вспышек с охватом свинопоголовья в помещениях, имеющих связь друг с другом общей вентиляцией. Отмечены случаи массовых заболеваний свиней в период усиления эпидемии гриппа среди людей [19].

Заболеваемость при первичной вспышке у свиней, может достигать 100 %, а летальность зависит от условий содержания и санитарно-гигиенического состояния животноводческих помещений (при соблюдении всех норм и рекомендаций составляет 1-4%) [5, 19]. Часто грипп осложняется вторичной микрофлорой, в этом случае летальность значительно возрастает.

Инкубационный период ГС составляет 24-72 часа, иногда он может достигать 6 дней. Болезнь протекает остро, подостро и атипично (латентно).

При остром течении температура тела повышается до 42 °С, у животных пропадает аппетит, они отказываются вставать. Слизистые оболочки глаз гиперемированы, отечны. Дыхание затруднено, после незначительных передвижений отмечается сухой кашель, из носа выделяется серозный экссудат, который засыхает вокруг ноздрей, образуя корочки, затрудняющие дыхание. Вследствие этого больные животные часто трутся о различные предметы и трясут головой для устранения этих корочек [46]. Иногда у свиней возникают носовые кровотечения. Чтобы облегчить затрудненное дыхание, возникающее вследствие отека и воспаления слизистой оболочки носоглотки, животные принимают позу «сидящей собаки». Развивается острая сердечная недостаточность, кожа ушей, нижней стенки живота, хвоста и копытца становится синюшной. У отдельных животных появляются экзематозная сыпь на коже, диарея, сменяющаяся запором, поражаются суставы [5].

У поросят 15-60 дневного возраста, являющихся наиболее восприимчивыми к ВГС, болезнь протекает с явлениями катаральной или катарально-гнойной пневмонии. При этом у них наблюдается одышка, кашель, в легких

прослушиваются хрипы. Кашель особенно резко выражен в момент движения. У таких животных болезнь часто заканчивается летальным исходом. В грудной полости, в бронхах и бронхиолах содержится серозная кровянистая жидкость, слизистая оболочка бронхов отечна, гиперемирована, иногда с кровоизлияниями [46]. Реберная плевра также отечна, гиперемирована, под плеврой иногда находят мелкоточечные кровоизлияния. Добавочные и сердечные доли легких уплотнены, на разрезе в бронхиолах видны слизистые пробки, диафрагмальные доли, как правило, без изменений. У некоторых животных выявляют серозный или серозно-фибринозный перикардит. Бронхиальные, средостенные, подчелюстные, заглоточные, околоушные и шейные лимфатические узлы увеличены, имеют очаги гиперемии и иногда точечные кровоизлияния. При осложнениях вторичной микрофлорой обнаруживают крупозную или гнойную пневмонию и плеврит [5].

Продолжительность болезни при остром течении 10-12 дней. Если среди взрослого поголовья свиней летальность не превышает 2-4 %, то среди поросят может достигать 70 %, что во многом зависит от условий содержания, и особенно от их обеспеченности материнскими иммуноглобулинами, а так же от уровня воздухообмена в помещении. При хорошем содержании и кормлении у некоторых животных выздоровление может наступить через 4-6 дней [19]. Возможны рецидивы заболевания.

При подостром течении, заболевание распространяется медленно с охватом в течение нескольких недель животных всех возрастных групп. Клинически грипп свиней проявляется признаками бронхопневмонии и плеврита. В результате развития экзематозных поражений появляются зуд кожи, расчесы и корочки, особенно в области ушей, хвоста, промежности [5]. Часто болезнь осложняется вторичной микрофлорой, и больные погибают от сальмонеллеза, пастереллеза, или от гемофильной инфекции.

В хозяйствах с хорошими условиями содержания и кормления у свиного поголовья возможно атипичное течение. У инфицированных свиней температура тела остается в пределах нормы, но отмечают конъюнктивиты, риниты и сухой, быстро проходящий кашель. Заболевшие поросята

выздоровливают в течение 3-6 дней. Атипичная форма гриппа свиней также может протекать и хронически [46, 47].

1.3.4. Лабораторная диагностика

Постановка диагноза основана на клинических, эпизоотологических, патологоанатомических и лабораторных данных.

Несмотря на яркую выраженность клинической картины заболевания, характерную для гриппа свиней, существует целый ряд патогенов, обладающих сходными клиническими проявлениями. Дифференциальную диагностику ГС проводят от: пастереллеза, сальмонеллеза, КЧС, АЧС, микоплазменной и хламидиозной пневмоний, гемофильного полисерозита и актинобациллезной плевропневмонии [39]. Основная трудность дифференциальной диагностики гриппа свиней от других вирусных респираторных заболеваний (аденовирусной инфекции, хламидийной и микоплазменной пневмонии, вируса Сендай) в том, что они все сопровождаются катаральными процессами в дыхательных путях.

При подозрении на наличие ВГС в лабораторию посылают истечения из носовой полости, кусочки пораженных легких, слизистой оболочки носовой полости, трахеи, бронхов, а также средостенные и бронхиальные лимфатические узлы от 3-4 поросят в первые дни болезни. Одновременно отправляют сыворотку крови, взятую с 7-21-дневным интервалом для выявления антител против ВГС [5]. Слизь либо смывы носовой полости у поросят с признаками ГС отбирают стерильным ватным тампоном и помещают в стерильную пробирку с раствором Хенкса, с добавлением антибиотика. Весь полученный патматериал отправляют в лабораторию в термосе со льдом.

Существует множество различных методов для детекции и типирования ВГС:

- обнаружение наличия вируса при помощи вирусовыделения;
- выявление специфических вирусных генов;
- серологические методы исследования.

«Золотым стандартом» при диагностике ГС является, выделение вируса на культуре клеток (Vero, MDCK и др.) или куриных эмбрионах, с его последующим

распознаванием и типированием лабораторными методами диагностики: ПЦР, ПЦР в реальном времени, ИФА, МФА (метод флуоресцирующих антител или иммунофлуоресценции), РГА, РТГА, РН, РСК или электронной микроскопией [103].

Для выявления ВГС используется культура первично-трипсинизированных клеток почки поросенка. Также применяют метод инфицирования патологическим материалом белых мышей. При их последующем патологоанатомическом вскрытии обнаруживают специфические видоизменения в легких [5]. При интраназальном заражении у мышей уже через 24-48 часов проявляются симптомы заболевания. Они обычно гибнут на 3-8 сутки после заражения. В легких павших мышей обнаруживают темно-красные участки влажные на поверхности разреза, гепатизацию. Мыши, при инфицировании ВГС, не чувствительны к подкожному, интраперитонеальному и внутримозговому заражению [39].

Патологоанатомический материал в форме слизи из носовой полости, полученный от свиней подозрительных по заболеванию ВГС, либо суспензии пораженных вирусом легких и трахеи в разведении 1:10, инокулируют в аллантоисную, либо амниотическую полость 12-суточных куриных эмбрионов, выдерживают в течение 48-72 часов при 37 °С (в этот период происходит максимальное накопление вирусного материала), при этом на теле эмбриона образуются геморрагии. Далее собирают аллантоисную и амниотическую жидкости инфицированных эмбрионов, центрифугируют 15 минут при 2000 оборотов в минуту, затем изучают на наличие вируса в РГА [5].

Проведение серологических исследований особенно актуально при бессимптомной или атипичной форме течения ГС. В этом случае, выявление в крови исследуемых свиней резкого увеличения концентрации специфических «антигриппозных» антител говорит о причастности ВГС к возникновению заболевания. Серологическая диагностика проводится путем сравнительного анализа парных проб сыворотки, полученных от одного и того же животного, с интервалом в 7-21 день, желательно чтобы первая из них была получена в самом

начале заболевания, а вторая - в его финальной стадии. Наличие в организме ВГС подтверждается в случае увеличения титра специфических антител от первой ко второй пробе сыворотки крови, более чем в 3 раза [39].

При проведении серологических исследований необходимо учитывать возраст, условия содержания и кормления животных, наличие вакцинации, а также сопутствующих заболеваний. Также важным являются сроки отбора сыворотки крови, условия ее хранения и транспортировки до места исследования. Корректность постановки диагноза серологическими методами исследования должна быть подтверждена выделением вируса гриппа из исследуемого патматериала [22].

Для проведения массовых мониторинговых исследований на наличие антител к вирусу гриппа свиней широкое применение получил метод серологической диагностики ИФА. В РФ, в большинстве случаев, используют коммерческие наборы ИФА для выявления антител к вирусу гриппа свиней типа А подтипов H1N1 и H3N2 производства фирмы IDEXX (США), а также ИФА набор «Грипп А-Серотест» производства ООО «Ветбиохим» (Москва).

Методы молекулярной диагностики (ПЦР и ПЦР в реальном времени) ВГС в последние годы получили широкое распространение за счет своей высокой чувствительности (даже в сравнении с «золотым стандартом» - выделением вируса на культуре клеток и куриных эмбрионах), возможности типирования вируса, а также одновременного исследования сразу большого количества проб и быстроты получения результатов (3-5 часов) [73, 75, 106].

Уникальная способность некоторых штаммов вируса гриппа к репликации в мышинных нейронах (нейровирулентность) использовалась в течение многих лет в качестве генетического маркера при изучении генетики вирусов гриппа [109].

ВГС агглютинирует эритроциты морской свинки, кур, утки, крысы, хорька, собаки, человека (0 группы) [39].

1.3.5. Иммуитет и специфическая профилактика

У свиней в течение 8-10 месяцев после выздоровления в крови обнаруживаются вируснейтрализующие антитела и антигемагглютинины,

которые предохраняют их от повторного инфицирования. Длительность иммунитета у переболевших поросят изучена недостаточно [46].

Для профилактики ГС во многих странах Европы и Северной Америки применяют инаktivированные вакцины: вирионные (содержат цельные вирионы); расщепленные (смесь структурных компонентов); субъединичные (только протективные антигены – НА и NA) [41]. В настоящее время в нашей стране вакцинные препараты против ВГС не разработаны, а зарубежные вакцины широкомасштабного применения не имеют. В связи с выявлением случаев одновременного распространения гриппа среди свиней и людей, вызванных одними и теми же этиологическими агентами, многие исследователи, считают, что назрела необходимость систематической вакцинации свиней против гриппа, чтобы исключить этот источник возбудителя инфекции для человека [39].

Главным принципом профилактики ГС является строгое соблюдение ветеринарно-санитарных и зоогигиенических требований по кормлению, уходу и содержанию свиней разных возрастных групп [19]. В первую очередь принимают меры по недопущению заноса вируса в хозяйство, путем карантинирования всех вновь ввозимых животных в течении 30 суток, предотвращению температурных стрессов и обеспечению в помещениях хорошего воздухообмена [19].

Лечение при ГС симптоматичное. Больным животным дают антимикробные препараты, предотвращающие размножение вторичной микрофлоры в дыхательных путях: антибиотики широкого спектра действия (стрептомицин, тетрациклин, левомицетин); сульфаниламидные препараты. Их применяют индивидуально или групповым методом (с кормом или водой). Дополнительно назначают витамины групп В и С [5].

При обнаружении вируса гриппа всех больных животных изолируют. Помещения для их содержания еженедельно подвергают профилактической дезинфекции горячим раствором гидроксида натрия, взвесью свежегашеной извести, растворами хлорсодержащих препаратов.

Единственной эффективной мерой искоренения ВГС в хозяйстве является полная депопуляция стада.

Заключение

Нарушение респираторной функции свиней является существенной проблемой как для крупных свиноводческих предприятий, так и для мелкого фермерства, нанося серьезный экономический ущерб по всему миру в целом, и в РФ в частности. Заболеваемость поросят вирусными респираторными заболеваниями колеблется в среднем от 30 до 70%, особенно сильный удар они наносят по молодняку 60-90 дневного возраста, где падеж может достигать 40 % [30, 35]. Наиболее широко распространенными вирусными агентами, приводящими к респираторной патологии свиней, являются – респираторно - репродуктивный синдром свиней (РРСС) (12-42%), цирковирусная болезнь свиней (ЦВБС) (18-65%) и грипп свиней (ГС) (10-77%). Клинически они проявляются истощением и отставанием в росте новорожденных поросят, лихорадкой, зачастую затрудненным дыханием, истечениями из носа, развивается синюшность ушей, хвоста и нижней стенки живота.

Лабораторную диагностику проводят методами ИФА и ПЦР, для ГС также применяют РТГА. Для исследования используют сыворотку крови, истечения из носа, альвеолярную жидкость, при посмертной диагностике от павшего животного отбирают кусочки селезенки, печени, легкого. В подавляющем большинстве случаев выявляется одновременно несколько патогенов [72, 96].

В настоящее время в РФ не проводится регулярных исследований на выявление ВРРСС, ЦВБС-2 и ВГС, а данные о характеристиках вариаций их вирусных геномов являются недостаточными. В этой связи представляется необходимым проведение широкомасштабных исследований для обнаружения возбудителей данных заболеваний и широты их распространенности, также важным является получение информации об их генной вариабельности на территории РФ.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная работа была выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней, отдельные этапы работы выполнялись в ООО «Ветбиохим», и в АНО «НИИ ДПБ».

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Материалы

2.1.1.1. Исследуемый материал

Образцы сыворотки крови свиней в количестве 18605 проб полученные из хозяйств различных регионов РФ и сопредельных государств в период 2004-2017 год:

Регионы РФ:

- Республика Башкортостан – 85 образцов
- Республика Бурятия – 1450 образца
- Республика Мордовия – 12 образцов
- Республика Татарстан – 6712 образцов
- Республика Удмуртия – 36 образцов
- Белгородская область – 639 образцов
- Брянская область – 18 образцов
- Владимирская область – 80 образца
- Волгоградская область – 161 образца
- Вологодская область – 19 образцов
- Воронежская область – 27 образцов
- Кировская область – 14 образцов
- Московская область – 1236 образцов
- Мурманская область – 75 образцов

- Нижегородская область – 37 образцов
- Новгородская область – 24 образцов
- Новосибирская область – 224 образцов
- Омская область – 149 образцов
- Орловская область – 40 образцов
- Пензенская область – 64 образца
- Пермская область – 485 образцов
- Псковская область – 26 образцов
- Рязанская область – 70 образцов
- Самарская область – 81 образец
- Свердловская область – 4979 образцов
- Смоленская область – 5 образцов
- Тверская область – 99 образцов
- Томская область – 717 образцов
- Тюменская область – 133 образцов
- Челябинская область – 55 образцов
- Ярославская область – 66 образцов
- Алтайский край – 303 образцов
- Краснодарский край – 375 образцов
- Приморский край – 10 образцов
- Ставропольский край – 6 образцов

Сопредельные государства:

- Республика Беларусь – 30 образцов
- Республика Казахстан – 63 образца

Патологический материал от павших и вынужденно убитых свиней в количестве 109 проб, полученные из хозяйств различных регионов РФ в период 2004-2017 год.

- паховые лимфоузлы – 25 образцов
- лимфоузлы (без описания) – 36 образцов
- легкие – 18 образцов

- печень – 17 образцов
- селезёнка – 13 образцов

2.1.1.2. Коммерческие наборы для исследования

Подготовку проб к исследованию проводили с использованием следующих коммерческих наборов:

- Набор для выделения ДНК из геля Wizard[®], DNA Purification System (Promega, США).
- Набор для выделения ДНК из геля QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия)
- Набор для очистки ПЦР-продуктов (Promega, Wizard[™] PCR Preps DNA Purification system for Rapid Purification of DNA Fragments)
- Набор для выделения плазмидной ДНК (Promega, DNA Purification System, Wizard[®]Plus, SV Minipreps)

В работе использовали следующие тест-системы и наборы для диагностики вирусных респираторных заболеваний свиней:

- Тест-система для обнаружения цирковируса свиней II типа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ООО "Ветбиохим", Россия)
- Тест-система для обнаружения респираторно-репродуктивного синдрома (PPCC) свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ООО "Ветбиохим", Россия)
- Тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ООО "Ветбиохим", Россия)
- Набор реагентов для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) иммуноферментным методом «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (ООО "Ветбиохим", Россия)
- Набор для выявления антител к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней иммуноферментным методом «PPCC-СЕРОТЕСТ плюс» (ООО "Ветбиохим", Россия)

- Набор для выявления антител к вирусу гриппа А иммуноферментным методом «ГРИПП А-СЕРОТЕСТ» (ООО "Ветбиохим", Россия)

- Набор антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (ОАО "Покровский Завод Биопрепаратов", Россия)

2.1.1.3. Оборудование и расходные материалы

Лабораторное оборудование:

Фотометр планшетный iMark Bio-Rad, амплификатор «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), твердотельный термостат «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), источник питания «Эльф» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), вортекс V-1 plus (Biosan, Латвия), вакуумный насос (Gast), настольная микроцентрифуга (Eppendorf, Германия), механические пипетки переменного объема (Eppendorf, Германия), прибор для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле (Хеликон, Россия), генератор льда AF100 (Scotsman, Италия), вакуумный насос (Gast), ламинарный шкаф 2-й степени защиты, центрифуга с охлаждением RC2-B (Sorvall), низкотемпературный холодильник (Nuare), водный термостат «Bromma» (LKB), трансиллюминатор, холодильник (Indesit), электронные настольные весы 1219MP (Sartorius), спектрофотометр «Biophotometr» (Eppendorf), фотокамера для фотографирования гелей C5060 Wide Zoom (Olympus).

Расходные материалы:

Микронаконечники на 0,1-2,5, 0,5-10 и 1-200 мкл. (Greiner, Австрия); наконечники на 100-1000 мкл. (Greiner, Австрия); микронаконечники с фильтром на 1-20, 1-200 и 100-1000 мкл. (QSP, США); пробирки объемом 0,6 мл тонкостенные для ПЦР (QSP, США); микроцентрифужные пробирки объемом 1,6 мл и 2 мл с градуировкой (Eppendorf, Германия); пластиковые пробирки с закручивающейся крышкой на 15 и 50 мл; чашки Петри 90мм (Greiner, Австрия); центрифужные пробирки (Nalgene, Италия); стеклянная лабораторная посуда с градуировкой и пластиковыми закручивающимися крышками (Scott Duran); конические колбы на 100, 250 и 500 мл; мерные цилиндры на 50, 250, 500 и 1000

мл; пробирки оптические на 200 мкл «MicroAmp»; 96-луночные оптические плашки «96-Well Optical Reaction Plate».

2.1.2. Методы

Исследования проводили с использованием следующих методов лабораторной диагностики:

2.1.2.1. Полимеразная цепная реакция

Исследования образцов сыворотки крови, органов и тканей свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием коммерческих тест - систем производства ООО «Ветбиохим» (Россия), согласно следующим этапам:

Выделение нуклеиновых кислот.

Для выделения нуклеиновой кислоты в чистый микроцентрифужные пробирки отбирали 200 мкл исследуемого материала органов или сыворотки крови (органы предварительно максимально механически измельчали и гомогенизировали в фосфатном солевом буферном растворе). Добавляли 600 мкл L6 (лизирующий буфер), ресуспензировали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. Далее центрифугировали 60 секунд при 13 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли к ней 40 мкл сорбента, затем и инкубировали 10 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе. Затем центрифугировали 30 секунд при 13 тыс об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Осадок двукратно промывали 100 мкл L2 (промывочный буфер), затем двукратно промывали L3 (70% раствор этилового спирта). Полученный осадок высушивали 10 минут при 56⁰С и затем элюировали нуклеиновую кислоту с сорбента добавлением 30 мкл деионизованной стерильной воды, инкубируя его 10 минут при 56⁰С, периодически перемешивая. Затем осаждали сорбент центрифугированием 30 секунд при 13 тыс об/мин, переносили в чистые эпидорфы и использовали в качестве матрицы в дальнейших постановках.

Постановка ПЦР.

Постановка ПЦР проводилась в 2 модификациях: двухстадийно (для ВГС и ВРРСС) и одностадийно (для ЦВС-2).

Двухстадийная модификация ПЦР: Первая стадия (ОТ-ПЦР) проводилась в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь состояла из: 5 мкл выделенного продукта (РНК), 10 пмоль каждого праймера, 0.25 ммоль каждого dNTP, 1.25 ед. Taq-полимеразы, 0.5 ед. M-MLV ревертазы, 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RNAzin, 10 ммоль Tris-HCl (pH=9.0), 50 ммоль KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 ммоль MgCl₂. Пробирки с готовой реакционной смесью помещали в автоматический амплификатор «Терцик», и запускали соответствующую программу амплификации.

Вторая стадия проводилась в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь состояла из: 5 мкл смеси после первой амплификации, 10 пмоль каждого праймера, 0.25 ммоль каждого dNTP, 1.25 ед. Taq-полимеразы, 10 ммоль Tris-HCl (pH=9.0), 50 ммоль KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 ммоль MgCl₂. Пробирки с готовой реакционной смесью помещали в автоматический амплификатор «Терцик», и запускали соответствующую программу амплификации.

Температурно-временные режимы, применяемые для амплификации, приведены в таблице 1 (для ВГС) и таблице 2 (для ВРРСС), соответственно.

Таблица 1 – Температурно-временные режимы, использованные для проведения ПЦР на обнаружение ВГС.

Показатели	Первая амплификация			Вторая амплификация		
	t °C	время	Количество повторений	t °C	время	количество повторений
пауза	50	-	-	95	-	-
цикл	50	30 мин	1	95	1 мин	1
	95	3 мин				
цикл	95	20 сек	30	95	20 сек	30
	55	30 сек		50	30 сек	
	72	45 сек		72	30 сек	
цикл	95	20 сек	1	95	20 сек	1
	60	30 сек		53	30 сек	
	72	45 сек		72	2 мин	
хранение	10	-	-	10	-	-

Таблица 2 – Температурно-временные режимы, использованные для проведения ПЦР на обнаружение ВРСС.

Показатели	Первая амплификация			Вторая амплификация		
	t °C	время	Количество повторений	t °C	время	количество повторений
пауза	50	-	-	94	-	-
цикл	50	45 мин	1	-	-	-
	94	5 мин				
цикл	94	20 сек	25	94	30 сек	30
	55	30 сек		55	30 сек	
	72	45 сек		72	30 сек	
хранение	10	-	-	10	-	-

Одностадийная модификация ПЦР: Реакция проводилась в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь состояла из: 5 мкл выделенного продукта (ДНК), 10 пмоль каждого праймера, 0.25 ммоль каждого dNTP, 1.25 ед. Taq-полимеразы, 10 ммоль Tris-HCl (pH=9.0), 50 ммоль KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 ммоль MgCl₂. Пробирки с готовой реакционной смесью помещали в автоматический амплификатор «Терцик», и запускали соответствующую программу амплификации.

Температурно-временные режимы, применяемые для амплификации ЦВС-2, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Температурно-временные режимы, использованные для проведения ПЦР на обнаружение ЦВС-2.

Показатели	t °C	время	количество повторений
Пауза	94°C	-	-
Цикл	94°C	45 секунд	35
	55°C	45 секунд	
	72°C	45 секунд	
Цикл	94°C	45 секунд	1
	55°C	45 секунд	
	72°C	5 минут	
Хранение	10°C	-	-

Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Детекцию получившихся фрагментов ДНК проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. В 2% агарозный гель вносили

по 7 мкл продуктов ПЦР. Электрофорез проводили с использованием Трис-ацетатного буфера (40ммоль трис-ацетата, 1ммоль ЭДТА, pH 7,6), содержащего бромистый этидий в концентрации 0.4-0.5 мкг/мл при напряжённости электрического поля 10-15 В/см геля в течение 30 минут. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом (длина волны $\lambda=254$ нм).

2.1.2.2. Секвенирование

Исходную нуклеотидную последовательность 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 осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 («Applied Biosystem», США) согласно рекомендациям производителя.

2.1.2.3. Иммуноферментный анализ

Для исследования сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) были использованы коммерческие наборы, производства ООО "Ветбиохим".

При использовании каждого набора постановку, учет и интерпретацию полученных результатов проводили согласно инструкции фирмы - производителя.

По 100 мкл предварительно разведенной в необходимой кратности, сыворотки крови вносили в лунки иммунологического планшета. Параллельно делали контрольные образцы контроль – (К-) и контроль + (К+). Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 1 часа. После 5-ти кратной промывки планшета фосфатно - солевой буфер с Твином 20 (ФСБТ) в лунки вносили по 100 мкл рабочего разведения раствора конъюгата, и вновь

инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем 5-тикратно промывали планшет ФСБТ и добавляли во все лунки по 100 мкл рабочего хроматоген – субстратного раствора, планшет оставляли на 20 минут в темном месте при комнатной температуре. Реакцию останавливали внесением 50 мкл стоп-раствора (H₂SO₄).

Результаты ИФА оценивали на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм соответственно. Относительное содержание вирус-специфических антител в исследуемом образце определяли по коэффициентам K_{инг.} и K_{св.}, отражающим уровень антител в испытуемой пробе по отношению к положительному контролю.

2.1.2.4. Реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) выполняли по общепринятому методу согласно МУ 3.3.2.1758-03 и в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

К 2-х кратным разведениям исследуемой сыворотки в физиологическом растворе (0,9% NaCl, pH 7,0-7,2), приготовленным в планшете с U-образными лунками, добавляли равный объем вируса (в титре 4 ГАЕ), осторожно встряхивали планшет и оставляли на контакт при комнатной температуре (18-22 °C) на 30 минут. Далее добавляли рабочий объем 1% суспензии куриных эритроцитов. Планшет осторожно встряхивали и помещали в холодильник (2-8 °C) на 60 минут. За титр антител принимали наивысшее разведение сыворотки, которое полностью тормозило гемагглютинацию.

2.1.2.5. Конструирование рекомбинантной плазмиды

Праймеры для создания рекомбинантной плазмиды, используемой как положительный контроль при разработке тест-системы для выявления ЦВС-2b, были использованы те же, что и при разработке самой тест-системы. С использованием этих праймеров был амплифицирован фрагмент, соответствующий размерам фрагмента ПЦР положительных образцов. В качестве матрицы использовали культуральный вирус ЦВС-2.

Выделение фрагментов ПЦР из геля.

Для выделения искомого фрагмента, проводили электрофорез в агарозном геле с продуктами амплификации. Полученный фрагмент ПЦР вырезали из геля и выделяли с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (Fermentas, Литва) согласно методике фирмы-производителя.

Лигирование.

Для получения рекомбинантной плазмиды использовали плазмидный вектор pGEM T-Easy (Promega, США). Реакцию проводили в конечном объёме 10 мкл. Реакционная смесь содержала 5-7 мкл очищенной ДНК вставки, 1 мкл вектора, 1 мкл лигазы T4 и до 10 мкл буфера для лигирования. Реакцию проводили в течение 10-12 часов, при 16°C.

Приготовление компетентных клеток E. coli.

Колонию клеток *E. coli* штамм *Top Ten* пересевали в 10 мл питательной среды LB (10% пептона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, pH=7,5) и инкубировали на качалке в течении 8 часов при 200 об/мин и 37°C. Пересевали 1 мл получившейся культуры в 9 мл среды LB и инкубировали культуру при 37°C с хорошей аэрацией, контролируя величину оптической плотности культуры. Оптическую плотность определяли спектрофотометром на длине волны $\lambda=600$ нм. При достижении середины логарифмической фазы роста оптическая плотность составляла 0.5 ОЕ. Далее культуру быстро переносили в стерильную центрифужную пробирку и охлаждали во льду. Клетки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. К осадку добавляли 20 мл охлажденного стерильного 0,1M CaCl₂. Осадок ресуспендировали и инкубировали 30 минут во льду, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут при 4 °C. Затем удаляли надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировали в 1мл 0,1M CaCl₂, инкубировали во льду от 2-12 часов, и добавляли стерильный глицерин (99,9%) до конечной концентрации в 15%.

Клетки аликвотили по 100 мкл в охлаждённые стерильные полипропиленовые пробирки и хранили при минус 70°C.

Трансформация E. coli плазмидной ДНК и лигазными смесями.

Электрокомпетентные *E. coli* размораживали на льду. К размороженным бактериям добавляли 1-2 мкл (50-150нг) плазмидной ДНК или 3-5 мкл лигазной смеси и инкубировали 1 час во льду, далее проводили тепловой шок при 42°C в течение 50-55 секунд. После этого клетки охлаждали, помещая пробирки обратно в лед. К аликвоте трансформированных клеток добавляли по 0,5 мл среды LB и инкубировали при 37°C с умеренным встряхиванием в течение 1 часа. Затем клетки высевали на чашки Петри с селективной средой: 1.5% L-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина. В дальнейшем проводили учёт роста колоний и проверку колоний на наличие вставки методом ПЦР. Для выделения плазмидной ДНК проводили пересев колоний в жидкую среду (по 3-10 мл на колонию) LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина.

Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК.

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор фирмы Promega DNA Purification System, Wizard®Plus, SV Minipreps (США). Выращивали ночную культуру *E. coli*, содержащую плазмиду, в 10 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл). Выделение проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Наличие плазмиды определяли методом гель-электрофореза.

Для подтверждения конструирования рекоминантные плазмиды секвенировали с использованием стандартных праймеров M13 (табл. 4).

Таблица 4 – Нуклеотидная последовательность праймеров M13

M13 F (прямой праймер)	5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3'
M13 R (обратный праймер)	5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ДНК (Applied Biosystems 3130, США) и анализировали с использованием компьютерных программ MacVector/AssemblyLign (Accelrys Inc., США), BioEdit 7.0.1.

2.2. Результаты исследований

Одной из главных задач данных исследований было определение распространенности основных респираторных вирусов свиней (ВРРСС, ЦВС-2, ВГС) на территории различных регионов РФ в настоящее время [2, 7], а также обобщение ретроспективных данных за предыдущие годы.

2.2.1. Оценка распространенности и анализ генетической variabilityности 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%. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследований сывороток крови свиней на наличие антител к ВРРСС за период 2004-2011 года

Регион №	Название области (республики)	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные проб	
				ИФА	
				Количество	%
1	Московская	8	585	283	48,4
2	Вологодская	1	19	5	26,3
3	Белгородская	5	543	290	53,4
4	Пензенская	1	64	2	3,1
5	Ярославская	2	66	11	16,7
6	Татарстан	5	6675	34	0,5
7	Новосибирская	1	224	142	63,4
8	Тюменская	3	81	43	53,1
9	Башкортостан	2	85	18	21,2

10	Краснодарский	6	175	32	18,3
11	Томская	2	364	117	32,1
12	Владимирская	2	80	20	25
13	Волгоградская	2	161	44	27,3
14	Тверская	2	99	20	20,2
15	Бурятия	1	3	0	0
16	Омская	3	149	61	40,9
17	Пермская	1	485	228	47
18	Свердловская	2	58	7	12,1
19	Самарская	1	81	0	0
20	Удмуртия	2	36	2	5,6
21	Брянская	1	5	0	0
22	Орловская	2	40	4	10
23	Ставропольская	1	6	1	16,7
24	Новгородская	1	24	4	16,7
25	Мордовия	1	12	2	16,7
26	Мурманская	1	75	14	18,7
27	Челябинская	1	55	3	5,5
28	Смоленская	1	5	1	20
29	Кировская	1	14	0	0
30	Рязанская	1	70	8	11,4
31	Приморский	1	10	0	0
32	Нижегородская	1	17	0	0
33	Воронежская	2	27	1	3,7
34	Псковская	1	26	0	0
Всего		68	10419	1397	13,4
Сопредельные государства					
1	Республика Беларусь	1	30	10	33,3
2	Республика Казахстан	2	63	5	7,9

Всего	3	93	15	16,1
-------	---	----	----	------

Из 34 исследованных регионов РФ в 27 было обнаружено наличие антител к ВРРСС. Антитела не были найдены только в 14 свиноводческих хозяйствах из 68 исследованных, по одному хозяйству из Московской, Владимирской, Свердловской, Самарской, Брянской, Орловской, Кировской и Нижегородской областях, Краснодарского и Приморского края, республиках Удмуртия и Бурятия, а также двух хозяйствах Республики Татарстан. Из 3 исследованных хозяйств сопредельных государств, антитела к ВРРСС были обнаружены в 1 хозяйстве Республики Казахстан и в 1 хозяйстве Республики Беларусь.

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). 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. Все пробы, поступившие из Республики Татарстан, были свободны как от РНК ВРРСС, так и от антител к нему. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие РНК вируса РРСС и вирус-специфических антител

Регион №	Название области (республики)	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	1	303	4	1,3	96	31,7
6	Нижегородская	1	20	13	65	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	Татарстан	1	37	0	0	0	0
Всего		14	7893	999	12,7	479	6,1

Результаты исследования патологического материала свиней, показанные в таблице 7, демонстрируют, 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).

Таблица 7 – Результаты исследования патологического материала свиней на наличие ДНК ЦВС-2, и РНК ВРРСС и ВГС

№	Исследуемый материал	Количество исследованных образцов	Количество положительных проб		
			ВРРСС	ЦВС-2	ВГС
1	Паховые лимфоузлы	25	13 / 52 %	11 / 44 %	0 / 0 %
3	Лимфоузлы	36	17 / 47,2 %	10 / 27,7 %	1 / 2,8 %
4	Легкие	18	9 / 50 %	6 / 33,3 %	1 / 5,5 %
5	Печень	17	6 / 35,3 %	4 / 23,5 %	0 / 0 %
6	Селезёнка	13	3 / 23,1 %	5 / 38,5 %	0 / 0 %
Всего		109	48 / 44 %	36 / 33 %	2 / 1,8 %

Для анализа генетической вариабельности 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. Сторонние нуклеотидные последовательности ВРСС, использованные для построения дендрограммы, были получены из банка данных GenBank. Длина секвенированных ПЦР-фрагментов составляла 376 п.н. На рисунке 1 представлена филогенетическая дендрограмма, построенная на основании сиквенса фрагмента гена NP (ORF-7) вируса РСС [7].

Филогенетический анализ показал, что изоляты вируса РСС-1 из Тюменской, Свердловской, Московской и Нижегородской областей, образуют с известными ранее последовательностями вируса РСС 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 РСС-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 РСС-1. В обследованных хозяйствах не было обнаружено изолятов вируса РСС-1 относящихся к субтипам 2 и 3 и характеризующихся высокой степенью вирулентности, хотя их циркуляция на территории России была ранее установлена [2, 113].

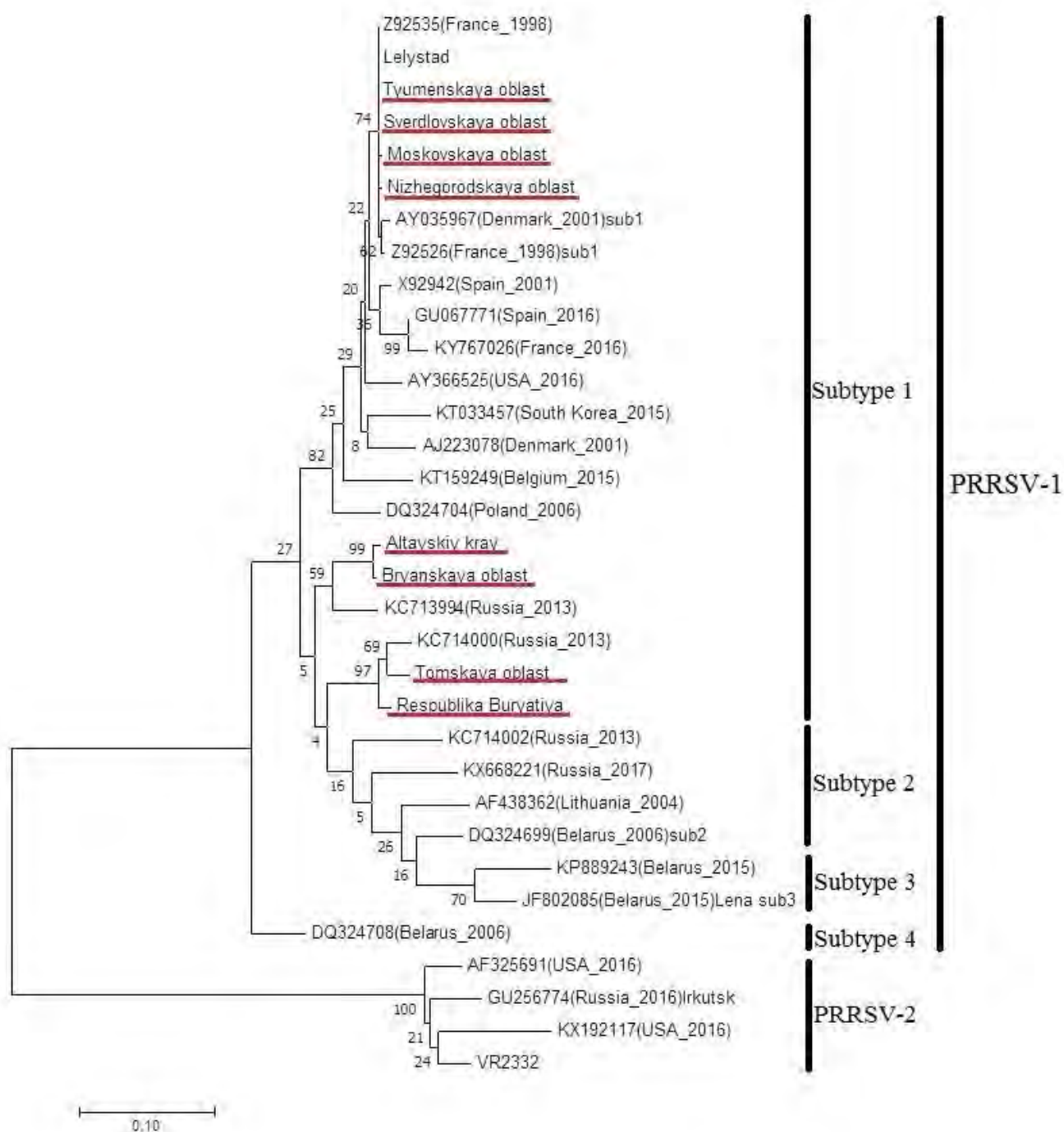


Рисунок 1 – Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании фрагментов генома ORF-7 BPPCC (376 п.н.)

В данном исследовании не были выявлены североамериканские генотипы вируса РРСС. Однако это не означает их отсутствие на территории РФ. Возможно, они циркулируют в регионах исследования в которых нами не проводились.

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

Исследования полученных образцов сыворотки крови свиней на наличие антител к ЦВС-2 проводились методом ИФА. Мониторинг проб сыворотки крови и патологического материала на наличие ДНК возбудителя – методом ПЦР.

Алгоритм диагностических исследований на ЦВС-2 был аналогичен таковому на РРСС. 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 исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследований сывороток крови свиней на наличие антител к ЦВС-2 за период 2004-2011 года

Регион №	Название области (республики)	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные проб	
				ИФА	
				Количество	%
1	Московская	8	570	322	56,5
2	Вологодская	1	19	3	15,8
3	Белгородская	5	526	256	48,7
4	Пензенская	1	64	50	78,1
5	Ярославская	2	66	46	69,7
6	Татарстан	5	1743	351	20,1
7	Новосибирская	1	194	140	72,2
8	Тюменская	3	81	31	38,3
9	Башкортостан	2	75	45	60
10	Краснодарский	6	235	112	47,6
11	Томская	2	359	140	39
12	Владимирская	2	80	21	26,3
13	Волгоградская	2	131	101	77,1
14	Тверская	2	99	65	65,7
15	Бурятия	1	3	1	33,3
16	Омская	3	148	80	54,1

17	Пермская	1	484	340	70,2
18	Свердловская	2	49	36	73,5
19	Самарская	1	81	12	14,8
20	Удмуртия	2	36	17	47,2
21	Брянская	1	5	2	40
22	Орловская	2	40	29	72,5
23	Ставропольская	1	6	6	100
24	Новгородская	1	24	10	41,7
25	Мордовия	1	12	12	100
26	Мурманская	1	75	42	56
27	Челябинская	1	55	39	70,9
28	Смоленская	1	5	0	0
29	Кировская	1	14	0	0
30	Рязанская	1	70	52	74,3
31	Приморский	1	10	0	0
32	Нижегородская	1	17	13	76,5
33	Воронежская	2	27	21	77,8
34	Псковская	1	26	22	84,6
Всего		68	5429	2483	43,7
Сопредельные государства					
1	Республика Беларусь	1	30	3	10
2	Республика Казахстан	2	63	38	60,3
Всего		3	93	41	45,1

Из результатов таблицы 8 видно, что в 31 из 34 исследованных регионов РФ было выявлено наличие антител к ЦВС-2, свободными от них оказались лишь Смоленская и Кировская области, а также Приморский край. Из 67 свиноводческих хозяйств, которые были исследованы, лишь в 7 антитела к данному вирусу обнаружены не были, соответственно по одному хозяйству из Московской, Смоленской, Тверской и Кировской областей, Краснодарского и

Приморского края, а также Республики Татарстан. Также, во всех 3 проверенных хозяйствах 2 сопредельных государств антитела были обнаружены.

Результаты комплексных исследований проб сыворотки крови и патологического материала свиней, отобранных в 2012-2017 гг., показали значительную распространенность ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах нашей страны. Результаты представлены в таблицах 7 и 9, соответственно.

Таблица 9 – Результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие ДНК ЦВС-2 и вирус-специфических антител

Регион №	Название области (республики)	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные проб		Положительные проб	
				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	20	100
7	Брянская	1	13	13	100	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 таблице 9, 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.

В одном из хозяйств Тюменской области было выявлено наличие пробы отрицательной на наличие антител, но положительной на наличие ДНК вируса. В хозяйстве республики Татарстан не было обнаружено ни антител к ЦВС-2, ни его нуклеиновой кислоты.

По данным представленным в таблице 7 видно, что ДНК ЦВС-2 выявлена в общей сложности в 36 пробах, что составляет 33% от всего числа исследованного патологического материала свиней. В основном она была обнаружена в паховых лимфоузлах (44%) и селезенке (38,5%).

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. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании сиквенса фрагмента гена ORF-2 ЦВС-2, представлена на рисунке 2 [7].

Анализ дендрограммы свидетельствует о том, что изоляты ЦВС-2 из Тюменской, Нижегородской, Томской областей и Алтайского края крайне близки к ранее известным последовательностям относящимися 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. Изоляты ЦВС-2 из Московской и Свердловской областей сходны с генетическими последовательностями выделенными с 2000 по 2015 гг. в Канаде, Китае, Южной Корее, КНДР и США и относящимися к генотипу ЦВС-2a. 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-2c обнаружено не было [2].

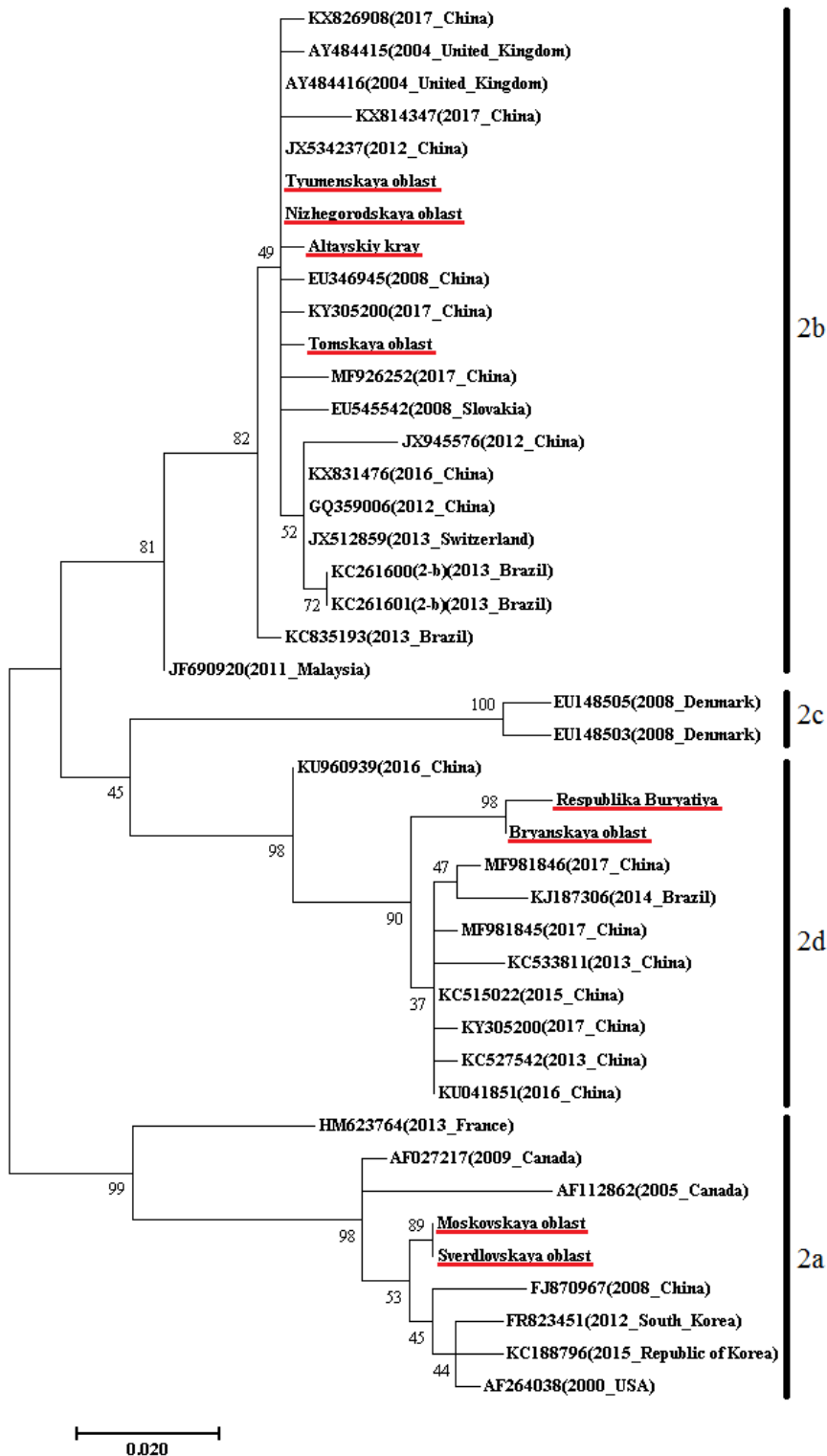


Рисунок 2 – Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании фрагментов генома ORF-2 ЦВС-2 (307 п.н.)

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.

Исследования сыворотки крови и патологического материала свиней на выявление РНК ВГС типа А, проводились с помощью метода молекулярной диагностики ПЦР. Результаты исследования представлены в таблицах 7 и 10.

Таблица 10 – 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	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
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
10	Татарстан	1	37	0	0	0	0
Всего		14	7893	1371	17,4	35	0,4

Из данных приведенных в таблице 10 видно, что нуклеиновая кислота ВГС была обнаружена в хозяйствах лишь 4 исследуемых регионах РФ, и в существенно меньшем количестве проб, чем антитела. Хозяйства остальных 6 регионов, оказались свободны от РНК ВГС. Это может свидетельствовать о том,

что данные регионы свободны от исследуемого возбудителя, однако возможно возбудитель имеется в неисследованных нами хозяйствах.

Из результатов, представленных в таблице 6 видно, что нуклеиновая кислота ВГС выявлена в 1 пробе лимфоузлов, и 1 пробе легкого, это составляет 1,8 % от общего числа исследованных образцов патологического материала свиней, что может говорить о не широкой распространенности этого вируса на территории РФ.

Для определения подтипа ВГА пробы сыворотки крови из 5 хозяйств, давшие положительный результат в ПЦР и ИФА, были дополнительно исследованы в РТГА. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты исследования сыворотки крови свиней методом РТГА

Результаты исследования	Регион (№ хозяйства)				
	Московская область (хозяйство №1)	Московская область (хозяйство №2)	Томская область	Тюменская область	Свердловская область
H1N1	-	-	-	-	-
H1N2	+	+	-	+	-
H2N3	-	-	+	+	+
H3N8	+	-	-	-	-
H4N6	-	-	-	-	-
H5N3	-	-	-	-	-
H6N2	-	-	-	-	-
H7N7	-	-	-	-	-
H8N4	-	-	-	-	-
H9N2	-	-	-	-	-
H10N7	-	-	-	-	-
H11N6	-	-	-	-	-
H12N5	-	-	-	-	-
H13N2	-	-	-	-	-
Результат РТГА	+	+	+	+	+

Результатом исследования стало, полное подтверждение результатов обнаружения ВГС типа А в данных хозяйствах. А так же, результаты исследования свидетельствуют о том, что в последние годы в свиноводческих хозяйствах на территории РФ циркулируют следующие подтипы вируса гриппа А: H1N2; H3N8 - Московская область, хозяйство №1; H1N2 - Московская область,

хозяйство №2; H2N3 - Томская область; H1N2; H2N3 - Тюменская область; H2N3 - 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. Результаты исследования представлены в таблице 12.

Данные таблицы 18 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 12 – Систематизированные результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие нуклеиновых кислот вируса РРСС-1, ЦВС-2, ВГА и вирус-специфических антител

№, название региона	N*	n**	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 общее количества исследованных; **** - ВРРСС – вирус РРСС-1.

2.2.5. Разработка тест-системы для выявления ЦВС-2b методом полимеразной цепной реакции

Из литературных источников известно, что в настоящее время в мире циркулирует несколько подтипов ЦВС-2: 2a, 2b, 2c и 2d. По результатам наших исследований было выявлено наличие 3 подтипов ЦВС-2 на территории РФ: ЦВС-2 a, b и d. Наиболее распространенным в свиноводческих хозяйствах РФ и вызывающим наиболее тяжелое течение заболевания из которых, является подтип 2b. В связи с этим была поставлена задача разработки диагностической тест-системы на основании молекулярного метода диагностики ПЦР для выявления ЦВС-2b.

С целью получения положительного контроля для дальнейших исследований, нами была сконструирована плазида содержащая фрагмент генома ЦВС-2b. Плазмиду получали с помощью векторной системы клонирования продуктов ПЦР - pGEM-T-Easy («Promega», США). В состав этой системы входит высококопийный вектор pGEM-T-Easy, содержащий 3'-терминальный тимидин на обоих концах в инсерционном сайте, что значительно улучшает эффективность лигирования продуктов ПЦР. Пара праймеров, использованная для клонирования, приведена в таблице 13.

Таблица 13 – Праймеры использованные для получения ПЦР продукта при конструировании рекомбинантной плазмиды

Название праймеров	Последовательность праймеров	Величина фрагмента ДНК
2b-F	CTG TTT TCG AAC GCA GTG	360 п.о.
2b-R	CTC AAA CCC CCG CTC TG	

Используя праймеры 2b-F и 2b-R, нами 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*.

После трансформации клеток *E.coli* (*штамм Top Ten*) были получены колонии, содержащие рекомбинантные плазмиды. Некоторые из колоний были проверены при помощи ПЦР с использованием соответствующих праймеров.

Плазмиды, оказавшиеся положительными при проверке методом 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 пяти измерений на приборе. Молекулярные концентрации были пересчитаны из массовых в соответствии с формулой:

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

- 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;
- $X_{\text{п. о.}}$ = 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.);
- $M_{1 \text{ п. о.}} = 660$ (г/моль) – средняя молярная масса 1 п. о.

Результаты измерений и расчетов приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Массовые и молекулярные концентрации рекомбинантной плазмиды

Исследуемый образец	Массовая концентрация, мкг/мкл	Средняя массовая концентрация, мкг/мкл	Молекулярная концентрация, мол/мкл
Плазмида ЦВС-2b	0,043	0,049	$1,42 \times 10^{10}$
	0,049		
	0,052		
	0,048		
	0,051		

Таким образом, среднее значение оптической плотности составило 0,049 мкг/мкл. Количество копий ДНК соответственно равно $1,42 \times 10^{10}$ мол/мкл.

Так как в конструкции полученной плазмиды используется фрагмент вирусного генома, она обладает высокой специфичностью, а также безопасна для человека, животных и окружающей среды.

В результате длительных исследований для разработки тест-системы, как наиболее простой и удобный метод [14], был выбран «гнездового» вариант ПЦР, потому, что он обладает большей чувствительностью в сравнении с одностадийным. Однако следует учитывать дополнительный риск контаминации, в связи с наличием второй амплификации, а также увеличение времени проведения анализа.

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 Lasergene v7.1, где была определена консервативная область, специфичная лишь для подтипа b ЦВС-2. 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), прогнозируемый амплифицированный фрагмент ДНК 1494 п.о.; праймеры для второго раунда ПЦР (2b-F и 2b-R) (захватывают часть ORF-2), прогнозируемый амплифицируемый фрагмент ДНК 360 п.о (таблица 15 и таблица 13, соответственно). Праймеры 2b-F и 2b-R, также были использованы на этапе получения рекомбинантной плазмиды содержащей фрагмент генома ЦВС-2b.

Таблица 15 – 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	

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

Первый раунд ПЦР:

94°C – 5 мин

94°C – 30 сек	} 30 циклов
54°C – 30 сек	
72°C – 40 сек	

72°C – 7 мин

Второй раунд ПЦР:

94°C – 5 мин

94°C – 30 сек	} 30 циклов
57°C – 30 сек	
72°C – 30 сек	

72°C – 7 мин

Далее нами была определена специфичность разработанной тест-системы, для этого использовалась 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, в качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду. Результаты представлены в таблице 16 и на рисунке 3.

Таблица 16 – Специфичность разработанной тест-системы ПЦР

№ пробы	Исследуемый материал	Детекция ДНК ЦВС-2b методом ПЦР
1	Рекомбинантная плазмида содержащая фрагмент генома ЦВС-2b	+
2	Культура клеток ППЭС, заражённая ПВС <i>шм. Ил-82</i>	-
3	Вирус РРСС <i>шм. Leylistad</i>	-
4	Вирус КЧС <i>шм. КС</i>	-
5	Вирус гриппа А А/swine/HongKong/9/98, А/Moscow/01/09 swine-like	-
6	Вирус болезни Ауески <i>шм. К</i>	-
7	Респираторный коронавирус свиней	-
8	<i>Leptospira</i> (серогр. <i>Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae</i>)	-
9	<i>Streptococcus suis</i>	-
10	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	-
11	<i>Pasteurella multocida</i> (серовары А, В, Д)	-
12	<i>Chlamydophila abortus, pecorum. Chlamydia suis</i>	-
13	<i>Salmonella choleraesuis, typhimurium</i>	-
14	Вирусная суспензия содержащая ЦВС-2а	-
15	Деионизированная вода	-

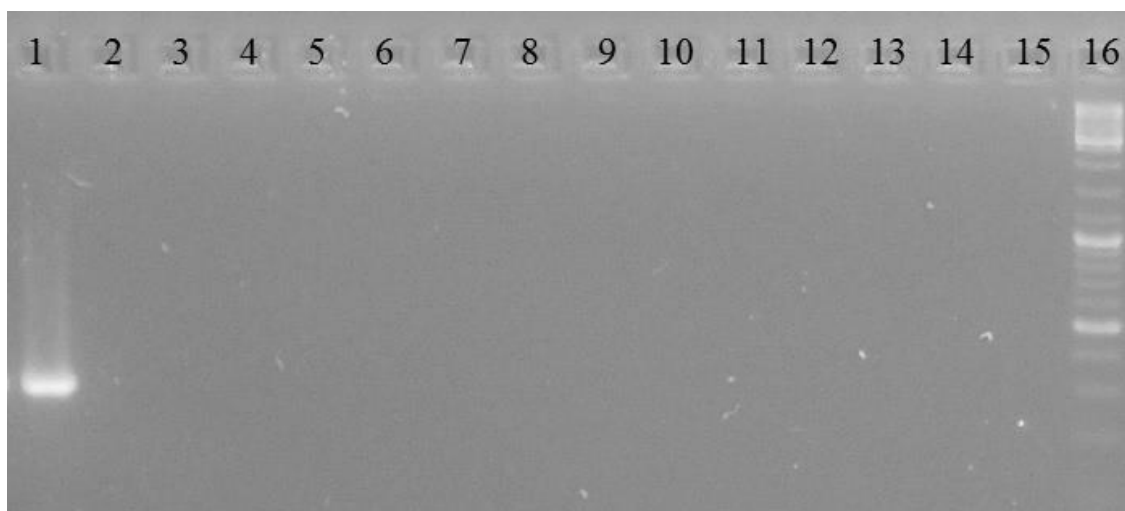


Рисунок 3 – Определение специфичности разработанной тест-системы ПЦР (360 п.н.). 1 – ЦВС-2b; 2- культура клеток ППЭС заражённая ПВС *шт. Ил-82*; 3 - вирус РРСС *шт. Lelystad*; 4 - вирус КЧС *шт. КС*; 5 - вирус гриппа А A/swine/HongKong/9/98; 6 - вирус болезни Ауески *шт. К*; 7 - респираторный коронавирус 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.

Полученные результаты демонстрируют 100% специфичность разработанной тест-системы на основе ПЦР для выявления ЦВС-2b.

Следующим этапом работы было, определение чувствительности разработанной тест-системы ПЦР. В качестве исследуемого материала при этом использовали полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую фрагмент генома ДНК ЦВС-2b.

Для этого нами была сделана серия последовательных десятикратных её разведений (до 10^{-10}) и проведено их исследование, в качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду.

Пределом чувствительности считали последнее разведение плазмиды, которое давало положительный результат в специфической реакции ПЦР. Результаты представлены в таблице 17 и на рисунке 4.

Таблица 17 - Определение аналитической чувствительности разработанной тест-системы ПЦР

Разведение плазмиды (мол/мкл)		Результат исследования
исходное	$1,42 \cdot 10^{10}$	+
10^{-1}	$1,42 \cdot 10^9$	+
10^{-2}	$1,42 \cdot 10^8$	+
10^{-3}	$1,42 \cdot 10^7$	+
10^{-4}	$1,42 \cdot 10^6$	+
10^{-5}	$1,42 \cdot 10^5$	+
10^{-6}	$1,42 \cdot 10^4$	+
10^{-7}	$1,42 \cdot 10^3$	+
10^{-8}	$1,42 \cdot 10^2$	+
10^{-9}	$1,42 \cdot 10$	-
10^{-10}	1,42	-
Отрицательный контроль		-

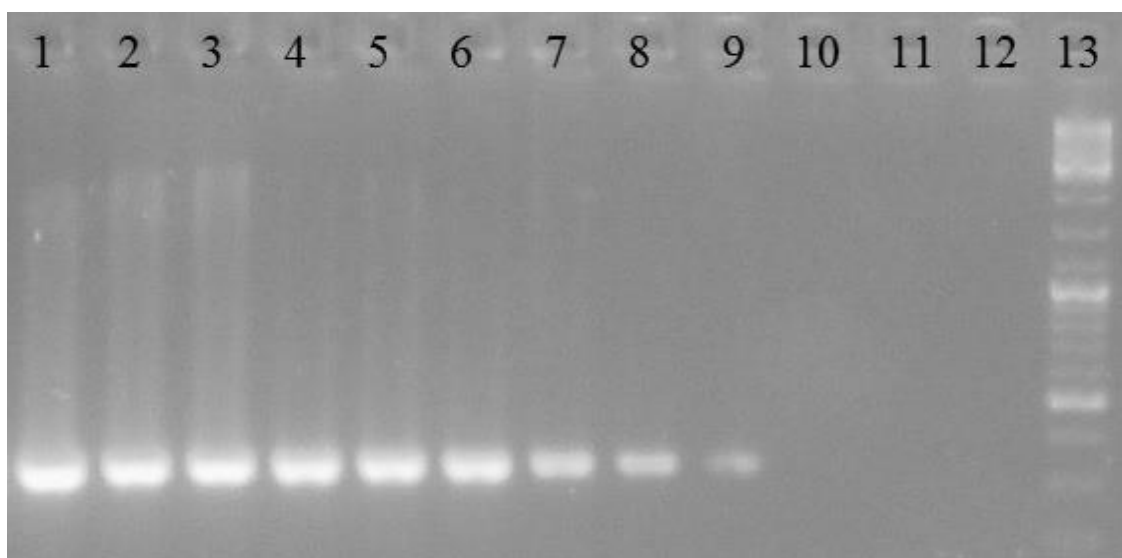


Рисунок 4 – Аналитическая чувствительность разработанной тест-системы ПЦР на матрице последовательных разведений полученной рекомбинантной плазмиды (360 п.н.). 1–исходная рекомбинантная плазмида; 2–11 - разведения рекомбинантной плазмиды 10^{-1} - 10^{-10} ; 12 - отрицательный контроль; 13 - маркер молекулярной массы.

В результате определения чувствительности выяснили, что разработанная тест-система выявляет ДНК ЦВС-2b в разведении рекомбинантной плазмиды до 10^{-8} , что соответствует $1,42 \times 10^2$ мол/мкл.

Следующим этапом разработки тест-системы стало изучение возможности специфического выявления ДНК ЦВС-2b в полевых образцах животных. ЦВС-2 локализуется в основном в клетках лимфоидной ткани (тимусе, селезенке, лимфатических узлах), легких, печени, почках, поджелудочной железе, а также вирус может быть выявлен в сыворотке крови поросят.

Нами было исследовано 90 проб, полученных из свиноводческих хозяйств РФ. 26,7% из них оказались положительны на наличие ЦВС-2b. Сводные результаты приведены в таблице 18.

Таблица 18 – 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 для обнаружения ЦВС-2b на основе полимеразной цепной реакции пригодна для рутинных диагностических исследований с целью обнаружения ЦВС-2b в пробах биологического материала различного происхождения, полученного от свиней.

В результате проведённых нами исследований была разработана «Тест-система для выявления цирковируса свиней II типа b подтипа методом полимеразной цепной реакции», и подготовлены документы для её регистрации (приложение А, приложение Б).

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирусные респираторные заболевания свиней широко распространены и причиняют значительный экономический ущерб во всем мире в целом, и в РФ в частности. Их распространенность достигает 30—70%, летальность может составлять до 40%. Тяжесть течения и широта распространения во многом зависят от иммунного статуса свиней, размера хозяйства, соблюдения санитарных правил и норм, а также от используемой в нём технологии производства. Вирусные респираторные заболевания чаще всего отмечают у поросят 60-120-дневного возраста, несколько реже в возрасте до 30 и больше 150 дней. Пик падежа наблюдается у 60-90 дневных поросят.

При исследовании свиней на выявление возбудителей вирусных респираторных заболеваний, чаще всего обнаруживаются ВРРСС (12-42%), ЦВС-2 (18-65%), ВГС (10-77%). В подавляющем большинстве случаев обнаруживаются 2 и более возбудителя одновременно.

Широкое распространение вирусных респираторных заболеваний в поголовье свиней на территории РФ остается одной из самых актуальных проблем для отечественного свиноводства.

Высокий экономический ущерб, наносимый вирусными респираторными заболеваниями как промышленному, так и крестьянско-фермерскому свиноводству, свидетельствует о необходимости проведения регулярных исследований на обнаружение данных заболеваний, в том числе, важным является получение актуальных данных по молекулярно-биологическим свойствам изолятов циркулирующих на территории РФ.

Нами было проведено исследование и обобщенно данных по 18605 образцам сыворотки крови свиней и 109 патологического материала полученных из 74 хозяйств 35 различных регионов РФ и из 3 хозяйств 2 сопредельных государств, в период 2004-2017 годов.

ДНК и РНК исследуемых нами заболеваний были обнаружены в 13 хозяйствах 9 регионов РФ, полностью свободными от них оказалась лишь хозяйства Республики Татарстан.

Антитела к вирусу РРСС были выявлены в 2411 пробах сыворотки крови свиней из 18405 исследованных, что составляет 13,1 %. РНК ВРРСС была обнаружена в 6,1 % исследованных проб сыворотки крови (в 479 из 7893 образцах) и в 44 % патологического материала (в 48 из 109 образцах) от павших или вынужденно убитых свиней.

В 41,3 % (в 5535 из 13415) исследованных проб сывороток крови свиней были обнаружены антитела к ЦВС-2. ДНК ЦВС-2 была выявлена в 9,7 % (в 762 из 7893) исследованных проб сывороток крови и в 33 % (в 36 из 109) проб патологического материала от павших или вынужденно убитых свиней.

В 17,4 % (в 1371 из 7893) исследованных образцов сыворотки крови выявлены антитела к ВГС типа А, РНК ВГС обнаружена в 0,4 % (в 35 из 7893) В 1,8 % (в 2 из 109) исследованных проб патологического материала от павших или вынужденно убитых свиней, также обнаружено присутствие нуклеиновой кислоты ВГС.

С целью выявления генетических различий между изолятами вирусов обнаруженных в исследуемых свиноводческих хозяйствах, был проведен анализ нуклеотидных последовательностей ВРРСС и ЦВС-2, соответственно. Сторонние нуклеотидные последовательности изолятов вирусов, использованные для построения дендрограмм, были получены из банка данных GenBank.

В результате филогенетического исследования проб, в которых была обнаружена нуклеиновая кислота ВРРСС, образовалось 2 группы изолятов ВРРСС (рисунок 1). В первую группу вошли изоляты ВРРСС европейского типа 1 субтипа: это изоляты выделенные нами из образцов, полученных из Тюменской, Свердловской, Московской и Нижегородской областей, а также изоляты из Франции, Дании, Испании, США, Южной Кореи, Бельгии и Польши выделенные с 1998 до 2016 год. Во вторую группу вошли изоляты относящиеся к ВРРСС европейского типа 2 субтипа: изоляты вирусов из образцов Алтайского края,

Брянской и Томской областей, а также Республики Бурятия, и изоляты из РФ, Литвы и Республики Беларусь, выделенные с 2004 по 2013 год. Вирусные изоляты Алтайского края и Брянской области, вместе с изолятом выделенным в 2013 году в РФ, образуют отдельную генетическую группу внутри ВРРСС европейского типа 2 субтипа, характерную именно для территории РФ.

Пробы сыворотки крови свиней, в которых, методом ПЦР, было обнаружено наличие РНК ВГС тип А, для типирования штамма вируса, а так же для подтверждения результатов исследования, были дополнительно исследованы методом РТГА (таблица 11). В результате, во всех дополнительно исследованных пробах было подтверждено наличие РНК ВГС типа А, а также была выявлена циркуляция 3 штаммов ВГС: H3N8 в одном хозяйстве Московской области; H1N2 в хозяйстве Тюменской области и двух хозяйствах Московской; H2N3 в Томской, Тюменской и Свердловской областях.

Филогенетический анализ образцов, в которых была выявлена ДНК ЦВС-2 (рисунок 2), показал, что изоляты Тюменской, Томской, и Нижегородской областей, а также Алтайского края, крайне близки к ранее известным последовательностям выделенными в 2004-2017 годах на территории Китая, Великобритании, Словакии, Швейцарии, Бразилии и Малайзии, относящимися к генотипу ЦВС-2b. Изоляты полученные из Московской и Свердловской областей образуют общую генетическую группу с изолятами вирусов, выделенными в 2000-2015 годах в Канаде, Китае, Южной Корее, КНДР и США, которые относятся к ЦВС-2a генотипу. Изоляты вирусов полученные из Брянской области и Республики Бурятия генетически близки с изолятами ЦВС-2d выделенными в Китае и Бразилии с 2013 по 2017 год. Таким образом, по результатам исследования можно говорить о циркуляции на территории РФ всех наиболее распространенных генотипов цирковируса свиней 2 типа: a, b и d.

В связи с высокой патогенностью ЦВС-2b, подтвержденной литературными данными [40, 70], актуальным в настоящее время является создание надежного и высокочувствительного метода его выявления.

Первым шагом разработки тест-системы на основе «гнездового» вариант ПЦР для выявления ЦВС-2b, стало получение положительного контроля. Наличие неинфекционного и стабильного контроля дает возможность повысить надёжность и правильность интерпретации получаемых результатов. Поэтому крайне важным является конструирование генно-инженерного положительного контроля на основе рекомбинантной плазмиды. В случае если на электрофореграмме будет отсутствовать специфическая полоса, соответствующая положительному контролю то, вирус, вероятно, был разрушен в ходе проведения анализа. Это может произойти по причине нарушения технологического процесса проведения анализа, или в связи с неправильным хранением исследуемых образцов. Чаще других в качестве положительного контроля применяются референтные штаммы вируса, исследуемые параллельно вместе с пробами. Однако подобные положительные контроли могут быть небезопасны, как для человека и животных, так и для окружающей среды. С целью избежать этого, необходимым является использование генно-инженерного положительного контроля.

Для конструирования такого контроля нами применялась векторная система клонирования продуктов ПЦР-pGEM T-Easy. Полученная рекомбинантная плазида является стабильной, выдерживающей многократное размораживание, что очень важно при проведении исследовательских работ.

Специфичность разработанной тест-системы была проверена с помощью панели образцов, которая содержала: полученную нами рекомбинантную плазмиду с фрагментом генома ЦВС-2b, культуру клеток ППЭС заражённую ПВС, вирусные и бактериальные патогены вызывающие схожие с ЦВС-2b нарушения у свиней (вирус РРСС, вирус КЧС, вирус гриппа А, вирус болезни Ауески, РКВС, бактерии рода *Leptospira*, *Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Chlamydophila*, *Salmonella*, а также вирусную суспензию содержащую ЦВС-2а (табл. 15). В результате визуализации проведённых исследований, на фореограмме (рисунок 1) проба содержащая ЦВС-2b имела специфическую полосу, тогда как у всех остальные исследованных проб таковая отсутствовала.

Исходя из этого можно сделать вывод, что подобранные нами праймеры специфичны лишь с ДНК ЦВС-2b и не дают перекрёстной реакции с другими патогенами.

Важным критерием при разработке диагностической тест-системы является чувствительность выявления ДНК возбудителя. Она должна быть достаточно высокой для однозначного определения присутствия возбудителя вируса в исследуемом материале. С целью выявления предела чувствительности разработанной тест-системы нами были использованы десятикратные разведения сконструированной рекомбинантной плазмиды, содержащей фрагмент генома ЦВС-2b. За предел чувствительности принимали последнее разведение, в котором при проведении электрофореза в агарозном геле, обнаруживался специфический фрагмент ДНК. Чувствительность нашей тест - системы составила $1,42 \times 10^2$ мол/мкл.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что чувствительность тест-системы позволяет достоверно выявлять наличие возбудителя в исследуемом материале и использовать её для обнаружения ЦВС-2b.

Следующим этапом нашей работы стало проведение исследований полевых образцов с использованием разработанной тест-системы (таблица 17). Всего было исследовано 90 проб полученных из различных свиноводческих хозяйств РФ в период с 2011 по 2017 года. В результате было выявлено 24 положительных образца, что составляет 26,7%. Среди положительных проб были сыворотки крови 20-30 дневных, 50-70 дневных и 90-100 дневных поросят, а также 220-240 дневных ремонтных свинок, основных свиноматок и органы от павших поросят. Относительно низкий процент положительных результатов, ещё раз говорит о генной вариабельности штаммов ЦВС-2 циркулирующих на территории РФ.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения диссертационной работы были продемонстрированы показатели распространенности основных вирусных респираторных инфекций в свиноводческих хозяйствах 35 регионов РФ и 2 сопредельных государствах за период 2004-2017 гг. Результаты распространенности сильно варьировались в зависимости от конкретного патогена, исследуемого региона, благополучия региона по данным заболеваниям и году исследования.

Были выявлены изоляты исследуемых вирусов циркулирующих на территории нашей страны. Так, обнаружено наличие нескольких генетических групп ВРСС 1-го субтипа, одна из которых характерна только для территории РФ, а другая сходна с изолятами выделенными в Западной Европе. Показана циркуляция, на территории исследованных регионов, трех генотипов ЦВС-2, это 2а, 2б и 2с. Показана циркуляция трех подтипов ВГС тип А, H1N2, H2N3 и H3N8, соответственно.

В ходе исследований было обнаружено значительное превалирование смешанных вирусных респираторных инфекций над моноинфекциями. Чаще всего была обнаружена ассоциация ВРСС-1 и ЦВС-2, самая часто выявляемая моноинфекция это ЦВС-2.

Разработана тест-система на основе ПЦР, для выявления ЦВС-2б. Она показала высокую аналитическую чувствительность и 100% специфичность как при исследовании серологических проб, так и различного патматериала, в связи с чем она может быть использована для исследовательских и рутинных диагностических целей.

5. 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-2a, 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% (2012-2017 гг.), РНК вируса была выявлена у 0,4% обследованных животных. Установлено, что циркулирующий вирус относился к H1N2, H2N3 и H3N8 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.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Рекомендуется проводить комплексные диагностические исследования свиноголовья 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 плазмида, содержащая фрагмент генома ЦВС-2b, может быть использована в качестве универсального положительного контроля в тест-системах аналогичной направленности.

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.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, К.П. Получение рекомбинантных нуклеокапсидных белков вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) и их применение в качестве специфических компонентов диагностической тест-системы для определения антител к вирусу PPCC // автореф. дис. ... канд. биол. наук / К.П. Алексеев – Москва. – 2004. – 29 с.
2. Алипер, Т.И. 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. Байбиков Т. З. Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) / Т.З. Байбиков, А. А. Гусев, Н. А. Яременко и др. // Ветеринария. – 2001. – № 3. – С. 18-19.
4. Белкин, Б.Л. Болезни молодняка свиней с диарейным и респираторным синдромом / Б. Л. Белкин, В. С. Прудников, Н. А. Малахова, Д. Н. Уразаев. - М.: КолосС, - 2007, - 128 с.
5. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных: учебник для студентов высших учебных заведений / Б.Ф. Бессарабов, А.А Вишутин, Е.С. Воронин и др. ; под общ. ред. А.А. Сидорчука. - М. : КолосС, 2007. – 671 с.
6. Богданова, В.С. Технология синтеза и очистки рекомбинантных антигенов вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней и цирковируса свиней второго типа и их применение в иммуноферментном анализе: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Богданова Валентина Саттаровна. – Щелково, 2007. – 139 с.
7. Булгаков, А.Д. 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.
8. Власова, А.Н. Филогенетический анализ изолятов вируса классической чумы свиней и вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, циркулирующих на территории России и Белоруссии // автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.Н. Власова – Москва. – 2003. – 26 с.
 9. Всемирная Организация Здравоохранения. Грипп // Информационный бюллетень №211, пересмотренный бюллетень за март 2003 г.
 10. Голубцов, А.В. Клинико-эпизоотологическая характеристика и профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней // автореф. дисс. ... канд. вет. наук / А.В. Голубцов. – Воронеж. – 2000. – 21 с.
 11. Гребенникова, Т.В. Молекулярно-генетический анализ и функционально значимые генетические мутации вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней // автореф. дис. ... док. биол. наук / Т.В. Гребенникова – Москва. – 2005. – 49 с.
 12. Гребенникова, Т.В. Средства лабораторной диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней / Т.В. Гребенникова, А.Д. Забережный, Е.А. Непоклонов, О.А. Верховский, Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер // Ветеринария. – 2005. – №10. – С.24-26.
 13. Деева, Э.Г. Эпизоотии гриппа птиц как манифестация пандемии / Э.Г. Деева, М.Ю. Еропкин, В.А. Григорьева и др. // Журн. микробиол. – 2006. – №1. – С. 81-87.
 14. Елисеева, О.В. 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.
 15. Есмагамбетов, И.Б., Иммуногенные и протективные свойства препаратов рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих гены консервативных

антигенов вируса гриппа А: дисс. ... канд. биол. наук: 14.03.09, 03.01.06/ И.Б. Есмагамбетов. - Москва, 2014. – 178 с.

16. Защепкина, В.В. Эпизоотическая ситуация по РРСС и ЦВС-2 свиней в России / В.В. Защепкина, М.М. Горячева // В сборнике: День Науки Сборник материалов конференций: в 6 частях. – 2016. – С. 53-56.

17. Крысенко, Ю.Г. Эпизоотологический мониторинг, патогенез и меры профилактики при ассоциированной форме цирковирусной инфекции свиней: дис. ... док. вет. наук: 06.02.06 / Ю.Г. Крысенко – Москва, 2012. – 338 с.

18. Кузьмин, Г.Я. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Г.Я. Кузьмин, Т.Е. Соловьева // Инфекционные болезни животных. – М.: КолосС, 2007. – С. 390-395.

19. Кукушкин, С.А. Грипп свиней (эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактики) / С.А. Кукушкин, Т.З. Байбииков, А.В. Каньшина, М.В. Чельшева // Ветеринария – 2009. – № 9. – С. 3-7.

20. Кукушкин, С.А. Разработка средств специфической профилактики репродуктивно-респираторного синдрома свиней // автореф. дис. ... док. вет. наук / С.А. Кукушкин – Москва. – 2009. – 34 с.

21. Лебон, Э. Цирковирус под Контролем / Э. Лебон, Ф. Жозель, Ж. Делиль, С. Гийесу, К. Делиль, Л. Миелли, Ж. Венет // Свиноводство. – 2014. – № 4. – С. 49-50.

22. Львов, Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А – дикие и домашние животные – человек / Д.К. Львов // Журн. микробиол. – 2006. – №3. – С. 96-100.

23. Малосолов А.С. Биологические и генетические характеристики цирковирусов свиней: дисс. ... канд. биол. наук 03.00.06, 03.00.23/ Малоголовкин Александр Сергеевич – Москва, 2009. – 132с.

24. Оганесян, А. С. Репродуктивно-респираторный синдром свиней в Российской Федерации: системы контроля, идентификация риска / А.С. Оганесян, М.А. Шибаев, Н. Е. Баскакова // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 4. – С. 53-61.

25. Орлянкин Б.Г. Новый цирковироз свиней: распространение и роль в патологии / Б.Г. Орлянкин, С.А. Раев, Т.И. Алипер // Свиноводство. – 2017. – № 5. – С. 64-65.
26. Орлянкин, Б.Г. Диагностика и специфическая профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т. И. Алипер и др. // Ветеринария. – 2000. – №10. – С. 16-19.
27. Орлянкин, Б.Г. Актуальные ветеринарные проблемы в промышленном свиноводстве / Б.Г. Орлянкин // VI Международный ветеринарный конгресс. – Россия. - 2016.
28. Орлянкин, Б.Г. Диагностика и специфическая профилактика РРСС / Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, М.И. Мусиенко // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. – №12. – С. 14.
29. Орлянкин, Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней / Б.Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. – 2005. – №11. – С. 3-5.
30. Орлянкин, Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика / Б.Г. Орлянкин, А.М. Мишин, Т.И. Алипер // Ветеринария Кубани. – 2010. - №3. – С. 5-7.
31. Орлянкин, Б.Г. Специфическая профилактика цирковирозных болезней свиней / Б.Г. Орлянкин, А.М. Мишин, Т.И. Алипер // Свиноводство. – 2011. – №2. – С. 67-68.
32. Орлянкин, Б.Г. Цирковиральная инфекция свиней / Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Ветеринария. – 2002. – № 11. – С. 48-51.
33. Орлянкин, Б.Г. Цирковирозные болезни свиней / Б.Г. Орлянкин, А.М. Мишин // Свиноводство. – 2010. – №5. – С. 50-53.
34. Прудников, С.В. Факторные инфекционные болезни свиней и их профилактика / Прудников, С.В. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – № 6. – С. 74-80.
35. Прудников, С.И. Факторные инфекционные болезни свиней и их профилактика / С.И. Прудников // Научно-практическая конференция «Роль

диагностики в контроле эпизоотических процессов на свиноводческих предприятиях в современных условиях». – Россия. – 2012.

36. Раев, С.А. 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.

37. Раев, С.А. Получение рекомбинантного капсидного белка цирковируса свиней второго типа (генотип 2b) в бакуловирусной 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.

38. Раев, С.А. Специфическая профилактика цирковирусных болезней свиней: современное состояние и перспективы / С.А. Раев // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2014. – № 1. – С. 26-29.

39. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёва, Е.А. Непоклонов и др.; - М.: Академкнига, 2006. 1 Т. – 910 с.

40. Семенцов, В.И. Цирковирусные болезни свиней (ЦВБС) / В.И. Семенцов, И.А. Болоцкий, А.К. Васильев, С.В. Пруцаков// Ветеринария Кубани. – 2009. – №5. – С.8-10.

41. Сергеев, В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М.: Библионика, - 2007.- 524 с.

42. Сидорин, В.А. Болезни свиней / В.А. Сидоркин, А.В. Егунова, С.П. Убираев, В.Г. Гавриш. – М. : Аквариум, – 2007. – 548 с.

43. Сидорчук, А.А. Причины респираторной патологии свиней в ряде промышленных комплексов России / А.А. Сидорчук, Е.А. Зеленуха // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2014. - № 1. - С. 17-24.

44. Соколов, М.А. Биологические свойства штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней // автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.А. Соколов – Москва. – 2004. – 25 с.
45. Стаффорд, В.В. Гистологическая диагностика респираторного синдрома свиней / В.В. Стаффорд // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2016. – Т. 79. – С. 283-288.
46. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. - М.: ВНИТИБП, 1998.- 928 с.
47. Хлопицкий, В.П. Комплексный контроль возбудителей инфекций при воспроизводстве свиней / В.П. Хлопицкий, А.А. Сидорчук, Н.И. Шумский // Ветеринария. - 2015. - № 3. - С. 8-12.
48. Шевцов, А.А. Экономически значимые болезни свиней бактериальной этиологии, методы их диагностики и средства профилактики / А.А. Шевцов, В.С. Русалеев, Ф.А. Ширяев, А.В.Потехин // Промышленное и племенное свиноводство. - 2008. - №4. - С. 31-35.
49. Шкаева, М. А. Иммуноферментный метод выявления антител к цирковирусу второго типа (ЦВС-2) с применением рекомбинантного капсидного белка ОРФ-2/ М. А. Шкаева, В.С. Богданова, В.В. Цибезов и др. // Вопросы вирусологии. - 2006. - №51(5). – С. 44-48.
50. Шкаева, М.А. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа // автореф. дис. ... канд. биол. наук / М. А. Шкаева – Москва - 2006. – 25 с.
51. Щелканов, М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа а (h5n1) в экосистемах северной Евразии (2005-2009 гг.) // автореф. дис. ... док. биол. наук / М.Ю. Щелканов – Москва. – 2010. – 55 с.
52. Щербаков, А. В. Мониторинг инфекционных болезней среди диких кабанов / Щербаков А. В., Кукушкин С. А., Тимина А. М. и др.// Вопросы вирусологии. – 2007. – №3. – С. 29-32.

53. Albina, E. Immune response and persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units / E. Albina, F. Madee, R. Cariolet, J. Torrison // *Vet. Rec.* - 1994. - V.134. - P. 567-573.
54. Allan, G. M. Immunostimulation, PCV-2, and PMWS / Allan, G. M., F. Mcneilly, S. Kennedy, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka // *Vet. Res.* – 2000. – V. 147, P. 170-171.
55. Baron, T. Report on the first outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation / T. Baron, E. Albina, Y. Leforban, F. Madec, H. Guilmoto , J. Plana Duran , P. Vannier // *Ann. Rech. Vet.* - 1992. - V.23. - P. 161-166.
56. Bautista, E.M. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus / E.M. Bautista, J.J.M. Meulenberg, C.S. Cho, T.W. Molitor // *Arch Virol.* - 1996. - V.141. - P. 357-365.
57. Belak, S. Molecular diagnosis of animal diseases: some experience of the past decade / S. Belak, P. Thoren // *Expert Rev. Mol. Diagn.* - 2001. - V.1. - P. 89-98.
58. Botner, A. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine / A. Botner, B.Strandbygaard, K.J. Sorensen, P. Have, K.G. Madsen, E.S. Madsen, S. Alexandersen // *Vet. Rec.* - 1997. - V.141. - P. 497-499.
59. Carman, S. Antibodies to PRRS virus in serum banks of Ontario swine (1978-1982) / S. Carman, S.E. Sanford, S. Dea // *Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr.* - Bologna, Italy, 1996. - P.76.
60. Cheung, A. Transcriptional analysis of porcine circovirus/ A. Cheung// *J. Virol.* - 2003. – V.305. - P. 168-180.
61. Christianson, W.T. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows / W. T. Christianson, J. E. Collins, D. A. Benfield, L. Harris, D.E. Gorcyca, D.W. Chladek, R.B. Morrison, H.S. Joo // *Am. J. Vet. Res.* - 1992. - V. 53. - P. 485-488.
62. Clark, E.G. Circovirus an emerging swine pathogen / E.G. Clark, J.C. Harding // *ISU Swine Disease Conf. Proc.* - 1997. - P.63-64.

63. Cross, K.J. Mechanism of cell entry by influenza viruses / Cross K. J., Burleigh L. M., Steinhauer D. A. // Expert review in molecular medicine. - 2001.: V.3, P.1–18.
64. Dea, S. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates / S. Dea, C.A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, D. Rogan // Archives of Virology. - 2000. – V.145(4). – P.659-688.
65. Denac, H. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen / H. Denac, C. Moser, J.D. Tratschin, M.A. Hofmann // J. Virol. Methods. 1997. - V. 65. - P. 169-181.
66. Diaz, I. Comparison of different vaccination schedules for sustaining the immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus / I. Diaz, M. Gimeno, A. Callen, J. Pujols, S. Lopez, C. Charreyre, F. Joisel, E. Mateu. - Veterinary journal. - 2013. - № 197. – P. 438-444.
67. Done, S.H. Porcine respiratory disease complex (PRDC)/ S.H. Done // The Pig Journal. - 2002. – V.50, P.174–196.
68. Drew, T.W. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus / T.W. Drew, J. J. M. Meulenberg, J. J. Sands, D. Paton // J. Gen. Virol. - 1995. - V.76. - P. 1361-1369.
69. Fauquet, C.M. Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses / C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, et al. // Elsevier. – 2005. – P. 681-693.
70. Finsterbusch, T. Porcine circoviruses — small but powerful / T. Finsterbusch, A. Mankertz // Virus Res. - 2009. - V. 143. - P. 177-183.
71. Firth, C. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2 / C. Firth, M.A. Charleston, S. Duffy, B. Shapiro, E.C. Holmes // Journal of Virology. - 2009. - V. 83. – P. 12813–12821.
72. Fouchier, R.A.M. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A.M. Fouchier, V. Munster, A. Wallensten, et al. // Journal of Virology. – 2005. – V. 79. – P. 2814–2822.

73. Fouchier, R.A.M. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene / R.A.M. Fouchier, T.M. Bestebroer, S. Herfst, et al. // J. Clin. Microbiol. – 2000. – V. 38. – P. 4096-4101.
74. Galina, L. Interaction between Streptococcus suis serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets / L. Galina, C. Pijoan, M. Sitjar, W.T. Christianson, K. Rossow, J.E. Collins // Vet. Rec. - 1994. – V.134(3). – P.60-64.
75. Hindiyyeh, M. Evaluation of a Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection and Differentiation of Influenza Viruses A and B during the 2001-2002 Influenza Season in Israel / M. Hindiyyeh, V. Levy, R. Azar, et al. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – V. 43(2). – P. 589-595.
76. Horter, D. C. Characterisation of carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / D.C. Horter, R.M. Pogradichniy, C.C.Chang, R.B. Evans, K.J. Yoon J.J. Zimmerman // Vet. Microbiol. - 2002. - V. 86. - P. 213-228.
77. Kekarainen, T. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution / T. Kekarainen, J. Segalés // Porcine Health Management. – 2015. - 1:17.
78. Kiupel, M. Cellular localization of porcine circovirus in post weaning pigs with chronic wasting disease / M. Kiupel, G. W. Stevenson, C. L. Kanitz, et al. // Eur. J. Vet. Pathol. - 1999. - V.5. - P. 77-82.
79. Kono, Y. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs / Y. Kono, T. Kanno, M. Shimizu, S. Yamada, S. Ohashi, M. Nakamine, J. Shirai, // J. Vet. Met. Sci. - 1996. - V.58.- № 10.- P.941-946.
80. Krakowka, S. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2) / S. Krakowka, J.A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D.M. Rings, G. Allan // Vet.Pathol. - 2001. - V. 38. - P. 31-42.
81. Kristensen, C. A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free / C. Kristensen, C. Hjulsgaard, L. Larsen // Porcine Health Management. - 2015. - 1:5.

82. Kurtz, S. Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins / S. Kurtz, L. Grau-Roma, M. Cortey, M. Fort, F. Rodriguez, M. Sibila, et al. // *Veterinary Research*. - 2014. – 45:29.
83. LeCann, P. Peglet wasting disease / P. LeCann, E. Albin, F. Madec , et al. // *Vet. Rec.*, 1997. – V. 141. – P. 6–60.
84. Lv, Q.Z. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2 / Q.Z. Lv, K.K. Guo, Y.M. Zhang // *Virus Genes*. – 2014. – V. 49. – P. 1–10.
85. Meehan, B.M.Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs / B.M. Meehan, F. McNeilly, D. Todd, et al. // *J.Gen.Virol.* - 1998. - V. 79. - P. 2171-2179.
86. Meng, X. J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implication for current vaccine efficacy and future vaccine development/ X. J.Meng // *Vet. Microbiol.* - 2000. - 74. - P. 309-329.
87. Mengeling, W.L. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / W.L. Mengeling, K.M. Lager, A.C. Vorwald, K.J. Koehler. - *Vet. Microbiol.* – 2003. – V.93. – P. 13–24.
88. Morozov, I. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome / I. Morozov, T. Sirinarumitr, S.D. Sorden, et al. // *J.Clin. Microbiol.* - 1998. - V. 36. - P. 2535-2541.
89. Nawagitgul, P. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein / P. Nawagitgul, I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden, P.S. Paul // *J. Gen. Virol.* - 2000. – V. 81. - P. 2281-2287.
90. Nelson, E.A Differentiation of US and European Isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies / E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J.E. Collins, D.A. Benfield// *J. Clin. Microbiol.* - 1993. - V.31. - P. 3184-3189.
91. Nielsen, H. S. Reversion of a live of porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations / H.S. Nielsen, M.B.

- Oleksiewicz, R. Forsberg, T. Stadejek, A. Bother, T. Storgaard // J. Gen. Virol. 2001. – V. 82. – P. 1263-1272.
92. OIE manual, chapter X.12.
 93. Opriessnig, T. What is new on PCV2: Diagnostic tools, novel strains and efficacy of current vaccine / T.Opriessnig // Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. - Japan. – 2015. – P. 19–20.
 94. Paton, D.J. Blue ear disease of pigs / D.J. Paton, I. H. Brown, S. Edwards, G. Wensvoort // Vet. Rec. - 1991. - V. 128. - P. 617.
 95. Rossow, K.D. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs/ K.D. Rossow, J.E. Collins, S.M. Goyal, E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, D.A. Benfield // Vet. Pathol. -1995. - V. 32. - P. 361-373.
 96. Scholtissek, C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds / C. Scholtissek, P.A. Bachmann, C. Hannoun // Virology. – 1983. – V. 129. – P. 521-533.
 97. Segalés, J. Porcine circoviruses / In editors: J.J. Zimmerman, L.Karriker, H. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson // Diseases of Swine. - USA. - Wiley-Blackwell. - 2012. - 983 p.
 98. Segales, J. Porcine circovirus type 2 infection: post weaning multisystemic wasting syndrome and other conditions / J.Segales, M.Domingo // Proceedings of the 17th IPVS congress, Ames, Iowa, USA. - 2001. – V.1. - P. 35-42.
 99. Segales, J. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review / J. Segales, M. Domingo // Vet. Quarterly, 2002. – V. 24. – P.109–124.
 100. Shibata, I. Serological property and replication in cell cultures of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in Japan / I. Shibata, K. Urino, M. Mori // J. Vet. Med. Sci. - 1996. - V.58. - P. 805-807.
 101. Snijder, E.J. The molecular biology of arteriviruses / E.J. Snijder, J.J.M. Meulenbergh // J. Gen. Virol. - 1998. - V.79. - P. 961-979.
 102. Sorden, S.D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome / S.D. Sorden // J. Swine Health and Prod., 2000. – V. 8. – P. 133–136.

103. Stambouliau, D. Influenza / D. Stambouliau, P.E. Bonvehi, F.M. Nacinovich, N. Cox // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2000 March. – V. 14. – P. 141-166.
104. Todd, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review / D. Todd // *Avian Pathol.* - 2000. - 29. - P. 373-394.
105. Tong, S., Rivaller P. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong, P. Rivaller, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2012. – V. 109. – P. 4269-4274.
106. Vabred, A. Comparison of three non-nested RT-PCR for the detection of influenza A viruses / A. Vabred, G. Sapin, B. Lezin, et al. // *J. of Clin. Vir.* – 2000. – V. 17. – P. 167-175.
107. Van Gucht, S. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs / Van Gucht S., G. Labarque, Van Reeth K. // *Vet Immunol. Immunopathol.* - 2004. – V. 102(3). – P. 165-178.
108. van Reeth, K. The explosive evolution of swine influenza viruses: Trying to see the wood for the trees, and the implications. / K. van Reeth // *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases.* - Japan. – 2015. - P. 23–25.
109. Van Voris, L.P., Nosocomial influenza B virus infection in the elderly / L.P. Van Voris, R.B. Belshe, J.L. Shaffer // *Ann. Intern. Med.* – 1982. - V.96 – P. 153 – 158.
110. Waddilove, A.F.J. Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field / A.F.J. Waddilove, E. Marco // *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congr.*, 2002. – P. 34.
111. Wootton, S.K. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / S.K. Wootton, E.A. Nelson, D. Yoo // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 1998. - V.5. - P. 773-779.
112. Xiao, C.T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV 2d / C.T. Xiao, P.G. Halbur, T. Opriessnig / *Journal of General Virology.* – 2015. – V. 96. - P. 1830-1841.
113. Yuzhakov, A.G. Genetic and pathogenic characterization of a Russian subtype 2 PRRSV-1 isolate / A.G. Yuzhakov, S.A. Raev, A.N. Skrylev, A.M. Mishin, T.V.

Grebennikova, O.A. Verkhovsky, A.D. Zaberezhny, I. Trus, H.J. Nauwynck, T.I. Aliper
// Veterinary Microbiology. – 2017. - V. 211. - P. 22-28.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)



УТВЕРЖДАЮ

Врио директора

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

А.М. Гулюкин

«08» июня 2018 г.

СТАНДАРТ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
СТО-00496165-0001-2018

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ II
ТИПА В ПОДТИПА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ

Технические условия

2018 г.

Приложение Б



УТВЕРЖДАЮ

Врио директора

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

А.М. Гулюкин

«08» июня 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для выявления цирковируса свиней II типа b подтипа
методом полимеразной цепной реакции

(организация-разработчик – ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И.Скрябина и
Я.Р.Коваленко РАН, г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для выявления цирковируса свиней II типа b подтипа методом полимеразной цепной реакции.

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы (таблица 1).

Таблица 1 - Состав наборов, входящих в настоящую тест-систему

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I – для выделения ДНК			
1	Раствор-1	18,0 мл	2 флакона
2	Раствор-2	12,0 мл	1 флакон
3	Раствор-3	12,0 мл	1 флакон
4	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
5	Деионизованная вода	2,0 мл	2 пробирки
Набор II - для выявления ДНК цирковируса свиней II типа b подтипа методом ПЦР			
1	Тaq-полимераза	0,03 мл	1 пробирка
2	Праймеры для ПЦР-1 ЦВС-2b	0,27 мл	1 пробирка
3	Праймеры для ПЦР-2 ЦВС-2b	0,27 мл	1 пробирка
4	Буфер для ПЦР-1	0,9 мл	1 пробирка
5	Буфер для ПЦР-2	0,9 мл	1 пробирка
6	Положительный контроль выделения ДНК ЦВС-2b (ПКВ ЦВС-2b)	0,2 мл	5 пробирок
7	Положительный контроль определения ДНК ЦВС-2b (ПКО ЦВС-2b)	0,075 мл	1 пробирка
8	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Набор III - для проведения электрофореза (на 5 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5 г	1 пакет
2	Концентрат буфера для электрофореза	20,0 мл	1 флакон
3	Бромистый этидий	0,15 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления цирковируса свиней II типа b подтипа в крови, органах и тканях от живых, павших и вынужденно убитых свиней, а также в инфицированных культурах клеток.

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с закручивающимися крышками вместимостью 30 мл и 20 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Наборы I, II и III отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока