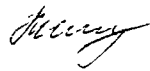


ТИМИНА Анна Михайловна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ**

**16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология»**

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук**



Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных»

Научный руководитель - кандидат биологических наук
Щербаков Алексей Владимирович

Официальные оппоненты: - доктор ветеринарных наук, профессор **Узюмов
Василий Лаврентьевич**, (ФГУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных», г. Владимир);
- доктор биологических наук, профессор
Цыбанов Солном Жамьянович, (ВНИИВВиМ.
г. Покров)

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
(ВИЭВ. г. Москва)

Защита диссертации состоится «29» июня 2006 года в 10 часов на
заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир. п. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных»

Автореферат разослан «26» мая 2006 года

Учёный секретарь диссертационного совета.

кандидат биологических наук.

старший научный сотрудник



Г.М. Семёнова

2006А
14242

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Эмерджентные болезни являются одной из наиболее актуальных проблем современного животноводства. В инфекционной патологии свиней важная роль принадлежит недавно получившим широкое распространение болезням, ассоциированным с цирковирусами.

У свиней идентифицированы два вида цирковирусов. Цирковирус свиней типа 1 (ЦВС-1) был обнаружен в 1974 году как нецитопатогенный контаминант перевиваемой культуры клеток почек поросят РК-15 (Tischer I., 1974) и считается непатогенным вирусом, так как не вызывает каких-либо клинических признаков у инфицированных животных. Цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2) был впервые выделен от больных поросят в Канаде в 1998 г. (Allan G.M., 1998; Meehan B.M., 1998; Ellis J.A., 1998) и является первичным этиологическим агентом синдрома мультисистемного истощения поросят-отъёмышей (СМИО). Кроме того, этот вирус ассоциирован с синдромом нефропатии и дерматитов поросят, а также вовлечён в респираторную и репродуктивную патологию свиней. ЦВС-2 распространён во всех странах с развитым свиноводством, причём встречается практически в 100% стад. Чрезвычайно широкое распространение ЦВС-2 и многообразие клинических проявлений инфекции делают его одним из наиболее значимых для современного свиноводства инфекционных агентов (Chae S., 2004). По современным оценкам заболевания, связанные с ЦВС-2, особенно СМИО, обходятся Европейским производителям в 600 млн. евро в год (Charreute S., 2005).

В России ЦВС-2 был впервые обнаружен в 2000 году (А.В. Щербаков и др., 2003). Цирковирусная инфекция была установлена во многих из обследованных хозяйств РФ. В то же время неизученным оставался широкий круг проблем, связанных с этой инфекцией: степень распространения цирковирусов среди домашних свиней и диких кабанов, генетическое разнообразие вируса, циркулирующего на территории России, вовлечённость ЦВС-2 в различные формы инфекционной патологии свиней. Обусловлено это

было тем, что отсутствовали, либо были несовершенны методы диагностики цирковиральной инфекции.

Цели и задачи исследования. Основная цель данной работы состояла в разработке методов диагностики цирковиральной инфекции свиней и применении разработанных методов для изучения распространения и клинического проявления этой инфекции на территории РФ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать метод обнаружения и типирования цирковирусов свиней, основанный на мультиплексной ПЦР;

- применить разработанный метод в диагностических исследованиях и изучить связь между различными формами инфекционной патологии свиней и наличием ЦВС;

- провести филогенетический анализ изолятов ЦВС-2, циркулирующих в свиноводческих хозяйствах и дикой фауне РФ;

- исследовать на наличие цирковирусов клеточные культуры, применяющиеся в ФГУ "ВНИИЗЖ" для вирусологических исследований и производства вакцин;

- получить рекомбинантный капсидный белок ЦВС-2 и разработать на его основе иммуноферментную тест-систему для выявления антител к вирусу в сыворотках крови свиней;

- применить разработанную иммуноферментную тест-систему для изучения распространения ЦВС-2 в хозяйствах РФ.

Научная новизна исследований. Разработан метод обнаружения и типирования цирковирусов свиней, основанный на мультиплексной ПЦР.

Изучены особенности клинического проявления цирковиральной инфекции свиней в хозяйствах РФ.

Проведен филогенетический анализ российских изолятов ЦВС-2, показано большое генетическое разнообразие вируса, циркулирующего в свиноводческих хозяйствах и дикой фауне РФ.

Получен рекомбинантный капсидный белок цирковируса свиней типа 2 и на его основе разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к ЦВС-2.

Проведён мониторинг цирковиральной инфекции свиней и показано чрезвычайно широкое распространение ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах РФ и среди диких кабанов.

Практическая значимость исследований. В результате проведённых исследований разработаны следующие методики:

«Методика обнаружения и типирования цирковирусов свиней с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции», одобренная учёным советом и утверждённая директором ФГУ ВНИИЗЖ 02.06.2005г.;

«Методика обнаружения антител к цирковирусу свиней типа 2 в непрямом варианте иммуноферментного анализа», одобренная учёным советом и утверждённая директором ФГУ ВНИИЗЖ 29.09.2005г.

Разработанные методики используются в диагностике цирковиральной инфекции свиней.

Публикации научных исследований. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и опубликованы на 5-й всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» (Москва, 19-21 октября 2004г.), на 3-й международной научно-практической конференции «Ветеринарные заболевания свиноводства: сучасний стан і шляхи розвитку» (Харьков, 2005г.), «International Conference on Animal Circoviruses and Associated Diseases» - Queen's University, (Belfast, Northern Ireland, UK, 11th-13th September 2005), на заседаниях учёного совета ФГУ "ВНИИЗЖ" в 2004-2006 гг.

Основные положения, выносимые на защиту:

Метод обнаружения и типирования цирковирусов свиней, основанный на мультиплексной ПЦР.

Результаты изучения клинических проявлений цирковиральной инфекции свиней в хозяйствах РФ.

Результаты филогенетического анализа российских изолятов ЦВС-2.

Рекомбинантный капсидный белок ЦВС-2 и разработанная на его основе иммуноферментная тест-система для выявления антител к вирусу.

Результаты использования разработанной иммуноферментной тест-системы в серологическом мониторинге цирковиральной инфекции.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 130 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические предложения и приложения. Список используемой литературы включает 207 источников, из которых 192 иностранных. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 15 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Патологический материал. В работе использовали органы и ткани от свиней и диких кабанов из хозяйств РФ.

Клеточные культуры. Клеточные культуры, используемые в ФГУ "ВНИИЗЖ" для вирусологических исследований и производства вакцин: РК-15, СПЭВ, ГК, Vero, ПСГК, Marc-145, ППК-66б, ВНК 21, СП.

Вирусы и бактерии. Для проверки специфичности мультиплексной ПЦР были использованы вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вирус болезни Ауески (ВБА), парвовирус свиней (ПВИС), цитомегаловирус свиней (ЦМВ), лимфотропный герпесвирус свиней (ЛГВ), вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС), вирус эпизоотической диареи свиней, ротавирус свиней и бактерии *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis*.

Staphylococcus sp., Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella choleraesuis.

Сыворотки. Использовали полевые сыворотки от домашних свиней и диких кабанов из свиноводческих и охотничьих хозяйств различных регионов России.

Бактериальные штаммы. Для трансформации и экспрессии рекомбинантных плазмид использовался штамм M15 E.coli: [pREP4] E.coli K12 (nal^r, str^s, rif^r, lac⁻, ara⁻, gal⁻, mtl⁻, F⁺, recA⁻, uvr⁺, lon⁻) pREP4 – kan^r. Источник штамма – фирма «Qiagen».

Плазмиды. Для получения экспрессирующей конструкции была использована плаزمида pQE (фирма «Qiagen»).

Пероксидазный конъюгат. Использовали коммерческий препарат антисвиных антител против иммуноглобулина IgG, меченных пероксидазой хрена, полученный из института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва.

Выделение ДНК. Выделение суммарной ДНК из патологического материала и культуры клеток проводили по модифицированному методу О.Г. Грибанова с соавторами (О.Г. Грибанов. 1996), либо с использованием набора реагентов GenePак™ «Биоком» (Москва).

Расчёт и синтез праймеров. Расчёт праймеров выполняли на основе нуклеотидных последовательностей ширковированных свиней типа 1 и 2, представленных в базе данных GenBank. Синтез праймеров осуществляла фирма «Синтол» (Москва).

ПЦР проводили в реакционной смеси следующего состава :2,5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ Mg²⁺, 0,2 мМ dNTPs, 1,0 ед. Taq-полимеразы, по 10 пмоль праймеров, 3 мкл раствора вирусной ДНК и воду до конечного объема 25 мкл. Амплификацию проводили на ДНК-амплификаторе Minicycler PTC-100 (MS Research, США) или Mastercycler gradient (США) при следующем температурном режиме: 2 мин предварительной денатурации при 94°C, 35 циклов амплификации (40 сек денатурации при 94°C, 30 сек отжига

праймеров при 55°C, 30 сек элонгации при 72°C) и 2 мин заключительной элонгации. При необходимости проводили второй раунд амплификации с внутренними праймерами в смеси аналогичного состава в течение 20-25 циклов. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2.0% агарозном геле, содержащем 0.001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Нуклеотидное секвенирование проводили с использованием набора «fmol DNA Cycle Sequencing System» (Promega, США) согласно инструкции. Для сравнительного анализа установленных последовательностей ДНК и графического построения дендрограмм использовали пакет прикладных программ SeqProgs.

Молекулярное клонирование продуктов ПЦР. Продукты ПЦР очищали от компонентов реакционной смеси по методике, аналогичной выделению ДНК. Реакции рестрикции и лигирования проводили в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей ферментов. Трансформацию и приготовление компетентных клеток *E.coli* проводили по методике Ханаана (1988). Культивирование *E.coli* проводили в среде LB и на LB-агаре при 37°C. Скрининг клонов, несущих рекомбинантные плазмиды, проводили с помощью аналитического выделения плазмид и последующего рестрикционного анализа. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* осуществляли методом щелочного лизиса по методу Бирнбойма и Доли, модифицированного Н.Г. Холодильным (1990).

Экспрессия рекомбинантных белков. Экспрессию рекомбинантных белков проводили добавлением индуктора (ИПТГ) в дневную культуру клеток, достигшую логарифмической фазы роста.

Очистка рекомбинантных белков. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью металл-хелатной хроматографии. Осадок клеток *E.coli* обрабатывали лизирующим буфером, затем центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин. К надосадку добавляли Ni-NTA agarose («Qiagen») и инкубировали при помешивании 15 мин. Сорбент дважды промывали лизирующим буфером. Белки переводили в раствор с помощью элюирующего буфера. Уровень

экспрессии и степень очистки препарата белка оценивали с помощью электрофореза в ПААГе. Концентрацию белков определяли по Бредфорду (Егоров, 1991).

Непрямой вариант ИФА. Тестирование сывороток в ИФА методом последовательных разведений и методом одного разведения проводили по общепринятой методике с некоторыми модификациями.

При использовании коммерческого набора «Ingezim circovirus IgG / IgM» (Ingenasa, Испания) постановку ИФА и интерпретацию результатов проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическая обработка результатов. Определение среднего арифметического (\bar{x}) при количестве опытов (n), среднего квадратичного отклонения (σ) средней арифметической проводили согласно руководству И.В.Полякова (1975).

Для обработки данных ИФА использовали компьютерную программу Power Basic, которая регрессионным анализом (приближение функций по методу наименьших квадратов) позволяла рассчитывать значения параметров уравнения A , B , значение коэффициента корреляции R , стандартную ошибку и построить линию регрессии.

При определении согласованности разработанной иммуноферментной тест-системы и коммерческого набора «Ingezim circovirus IgG / IgM» (Ingenasa, Испания) использовали метод капа-статистики (Shoukri M.N., 1996; С.А. Дудников, 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка мультиплексной ПЦР для выявления и типирования цирковирусов свиней

В результате анализа нуклеотидных последовательностей генома цирковирусов, представленных в базе данных GenBank, были установлены участки гена ORC2, в которых наблюдались значительные отличия между ЦВС-

1 и ЦВС-2 и, одновременно, высокая консервативность последовательностей для всех изолятов в пределах типа.

Для выявления и типирования цирковирусов свиней были сконструированы три праймера, один из которых является универсальным для обоих вирусов, а два других – видоспецифичными для ЦВС-1 и ЦВС-2. Праймеры были рассчитаны таким образом, что фрагменты ДНК, амплифицируемые в ходе ПЦР, имеют различную длину: 613 пар нуклеотидов для ЦВС-2 и 370 п.н. для ЦВС-1. Это позволяет определять тип цирковируса свиней в исследуемых пробах по размеру ампликона. Взаимное расположение праймеров на геноме представлено на рисунке 1. Для увеличения аналитической чувствительности метода система была дополнена двумя внешними праймерами, универсальными для обоих типов.

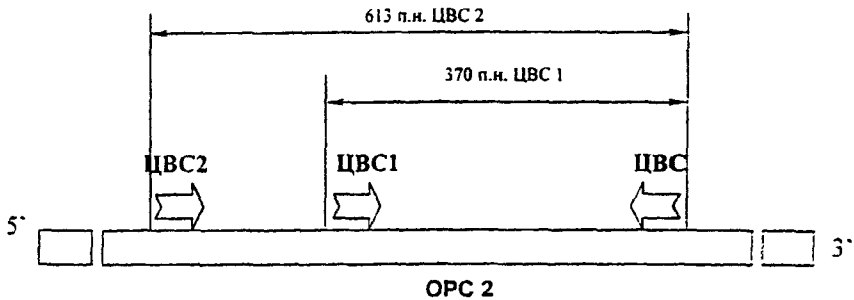


Рис. 1. Расположение на геноме универсального и типоспецифичных праймеров для обнаружения и дифференциации цирковирусов свиней
 Примечание: ЦВС – универсальный праймер для цирковирусов свиней
 ЦВС1 и ЦВС2 – специфичные праймеры для ЦВС типа 1 и типа 2 соответственно

На рисунке 2 показаны возможные результаты мПЦР. Как видно из фотографии агарозного геля, в пробах, содержащих ЦВС-2, синтезируется фрагмент ДНК длиной 613 п.н. (треки 8, 9, 10, 11), в пробах, содержащих ЦВС-1, амплифицируется фрагмент длиной 370 п.н. (треки 4, 7), в пробах, содержащих оба вируса, два фрагмента соответствующей длины (треки 5, 12).

Для проверки специфичности метода были использованы материалы, содержащие другие вирусные или бактериальные патогены, часто

обнаруживаемые у больных свиней: вирус РРСС, вирус болезни Ауески, парвовирус свиней, цитомегаловирус свиней, тимфотропный герпесвирус свиней, вирус ТГС, вирус эпизоотической диареи свиней, ротавирус свиней. *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella choleraesuis*. В пробах, содержащих перечисленные инфекционные агенты, в мПЦР со специфичными для ЦВС праймерами не наблюдалось синтеза фрагментов ДНК.

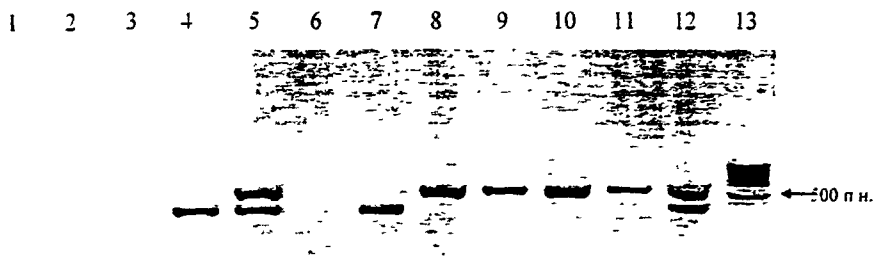


Рис. 2. Обнаружение и типирование цирковирусов свиней методом мультиплексной ПЦР

Примечание: Трек 1 – отрицательный контроль:

Треки 2, 3, 6 – отрицательные пробы:

Треки 8, 9, 10, 11 – тканевые суспензии от поросят, содержащие ЦВС-2:

Треки 4, 7 – культуры клеток, содержащие ЦВС-1:

Трек 5 – культура клеток содержащая ЦВС-1 и ЦВС-2:

Трек 12 – положительный контроль (смесь ЦВС-1 и ЦВС-2);

Трек 13 – маркер (снизу вверх: 100, 200, 300, 400, 500, 600 п.н. и т.д.).

Таким образом, разработанный метод позволял специфически выявлять и типировать цирковирусы свиней в пробах патологического материала и клеточных культурах. По результатам комиссионных испытаний предложенная «Методика по обнаружению и типированию цирковирусов свиней с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции» была одобрена Учёным советом и утверждена директором ФГУ ВНИИЗЖ

Применение мПЦР в диагностических исследованиях

Согласно данным зарубежной литературы, с ЦВС-2 ассоциированы различные заболевания свиней: синдром мультисистемного истощения

отъемышей (СМИО), пневмонии, дерматит и синдром нефропатии (ДСНП), врожденный тремор (ВТ) и некоторые другие.

Чтобы определить роль цирковирусов в инфекционной патологии свиней в животноводческих хозяйствах РФ, с использованием разработанного метода исследовали более 500 проб патологического материала. Пробы были получены в период 2000-2005 гг. из 106 хозяйств различных регионов РФ. На наличие ЦВС исследовались органы и ткани от свиней с респираторной патологией и признаками СМИО, от мертворожденных поросят, свиноматок с нарушением воспроизводительной функции или агалактией, свиней с дерматитами, признаками нефропатии, патологией нервной системы. Кроме того, анализировали органы и ткани клинически здоровых животных, в том числе сперму хряков-производителей.

Основными формами клинического проявления ЦВС-2 инфекции в странах Западной Европы и Северной Америки является СМИО и комплекс респираторных заболеваний, причем часто бывает трудно их дифференцировать. Проведенный нами анализ ситуации показал, что в российских свиноводческих хозяйствах СМИО также тесно взаимосвязан с респираторным комплексом, и эти две формы инфекционной патологии очень

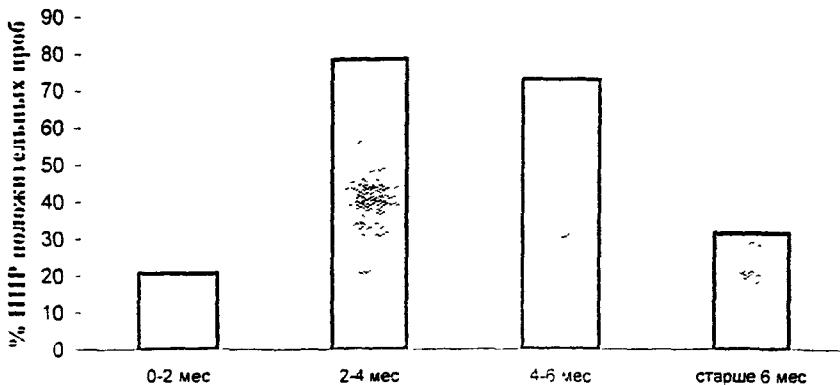


Рис. 3. Зависимость обнаружения ЦВС-2 методом ПЦР от возраста свиней

трудно разграничить. В российских хозяйствах истощение поросят, как правило, является следствием развития у них респираторных заболеваний в послеотъемном возрасте, и поражение органов дыхания является главной формой патологии у поросят с признаками истощения.

За период 2000-2005 гг. на наличие ЦВС была исследована 321 проба патологического материала от свиней с респираторной патологией. Исследовались различные возрастные группы свиней: от новорожденных поросят до свиноматок. Зависимость частоты обнаружения ЦВС-2 в патматериале от возраста животных отражена на рисунке 3.

Наибольшее количество ЦВС-положительных животных (78,3%) приходилось на возраст 2-4 месяца, что соответствует послеотъемному периоду. Высокий процент (72,7%) обнаружения ЦВС-2 наблюдался и у поросят в период откорма (4-6 месяцев). Частота обнаружения ЦВС-2 у поросят-сосунов и свиноматок с респираторной патологией была значительно меньше: 20,8 и 31,5 % соответственно. Таким образом, наши исследования подтвердили, что респираторные заболевания, ассоциированные с ЦВС-2, присущи, главным образом, поросятам послеотъемного периода.

Примечательно, что именно у поросят-отъемышей респираторная

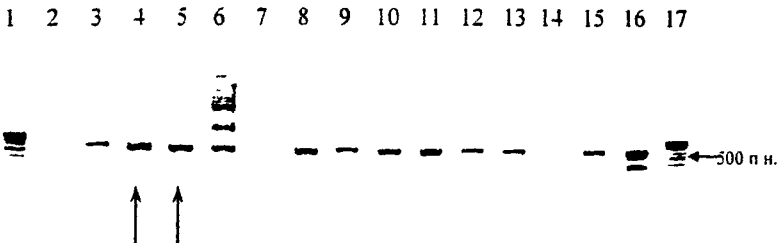


Рис. 4. Обнаружение ЦВС-2 методом мПЦР в различных органах и тканях поросёнка с поражениями лёгких и истощением

Примечание:

треки 1. 17 - маркер (снизу вверх: 100. 200. 300. 400. 500. 600. 700 п.н. и т.д.).

трек 2 – отрицательный контроль.

треки 3-12 – результаты мПЦР с ДНК из следующих органов и тканей больного поросенка: сердца, лёгких, лимфоузлов, селезёнки, головного мозга, кишечника, поджелудочной железы, почек, печени, миндалин, крови, сыворотки, носовых истечений;

трек 16 – положительный контроль (смесь ЦВС-1 и ЦВС-2).

клиника сопровождалась истощением, тогда как у других возрастных групп признаки СМНО были выражены в гораздо меньшей степени или вовсе отсутствовали.

На рисунке 4 показаны результаты тестирования на наличие ЦВС-2 органов и тканей поросёнка с респираторной патологией и признаками СМНО. Как видно из фотографии, методом мПЦР ЦВС-2 обнаруживали во всех анализируемых внутренних органах и тканях за исключением головного мозга и сыворотки крови. Наличие вируса в столь широком спектре органов свидетельствует о мультисистемном характере заболевания.

Таблица 1

Результаты комплексного исследования патологического материала от поросят с респираторной патологией и истощением на наличие инфекционных агентов

№ хозяйства область, край	Обнаруженные возбудители				
	ЦВС-2	другие вирусы	сем Pasteurellaceae	микоплазмы	другие бактерии
№ 1 Московская	+	-	<i>H. parasuis</i> <i>A. pleuropneumoniae</i>	-	-
№ 2 Новгородская	+	PPCC ЦМВ	<i>P. multocida</i> (D) <i>H. parasuis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	стрепто- кокки, стафило- кокки
№ 3 Новосибирская	-	PPCC	<i>P. multocida</i> (D)	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	стрепто- кокки
№ 4 Вологодская	-	PPCC ЦМВ ЛГВ	<i>H. parasuis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	стрепто- кокки
№ 5 Орловская	-	PPCC	<i>H. parasuis</i>	-	-
№ 6 Рязанская	+	PPCC	<i>H. parasuis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	-
№ 7 Краснодарский	-	PPCC ПВИС	<i>H. parasuis</i>	<i>M. hyorhinis</i>	-
№ 8 Хабаровский	-	PPCC ВБА ЦМВ ЛГВ	<i>P. multocida</i> (A) <i>H. parasuis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>	-
№ 9 Белгородская	-	PPCC ЦМВ	<i>P. multocida</i> <i>H. parasuis</i> <i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	сальмонел- лы
№ 10 Самарская	-	PPCC ЦМВ ЛГВ	<i>P. multocida</i> (A) <i>H. parasuis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i>	стрепто- кокки

Необходимо отметить, что в наших исследованиях практически не было случаев, чтобы ЦВС-2 был обнаружен в легких больных поросят как единственный инфекционный агент. Все случаи респираторных заболеваний и СМНО имели форму смешанной инфекции. Наряду с цирковирусом в материале от больных поросят часто обнаруживали вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней и различные бактерии: *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorheumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* и другие. Эти результаты согласуются с точкой зрения, согласно которой полная клиническая картина, характерная для СМНО, развивается при совместном действии ЦВС-2 с другими инфекционными агентами.

В таблице 1 в качестве примера приведены результаты обследования нескольких крупных свинокомплексов, в которых у поросят периодов дорастивания и откорма наблюдали признаки поражения респираторной системы и синдром истощения. Как видно из таблицы 1, в лёгких поросят одновременно с ЦВС-2 обнаруживали другие инфекционные агенты вирусной и бактериальной природы.

Помимо СМНО и респираторной патологии с ЦВС-2 связывают ряд других заболеваний: дерматит и синдром нефропатии, врождённый тремор, репродуктивные нарушения и перинатальный миокардит, гранулематозный энтерит, экссудативный эпидермит, некротизирующий лимфаденит, некротизирующий трахеит и другие. В связи с этим на наличие ЦВС нами были исследованы пробы патматериала от свиней с нарушениями воспроизводительной функции, поражениями почек, дерматитами и патологией ЦНС.

При исследовании 53 проб патматериала от абортированных плодов ЦВС-2 не обнаружили ни разу, а при исследовании плацент от абортировавших свиноматок этот вирус выявили лишь в одном случае из 46. Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о незначительной роли цирковирусов в репродуктивной патологии свиней в хозяйствах РФ.

Для изучения роли хряков-производителей, как фактора передачи вируса, мы провели исследование 85 образцов спермы хряков, поступивших на анализ из пяти свиноводческих хозяйств. В nested-ПЦР не выявили ни одного ЦВС-положительного образца.

При исследовании патматериала от свиной с поражениями почек и дерматитами ЦВС-2 обнаружили в 2 образцах из 15. У свиной с симптомами поражения центральной нервной системы цирковирсы не выявили ни в одном из исследованных случаев.

Таким образом, в результате проведённых исследований было установлено, что в российских хозяйствах ЦВС-2 ассоциирован, главным образом, с респираторной патологией и синдромом истощения поросят послеотъёмного периода. Роль этого вируса в других формах инфекционной патологии свиной в хозяйствах РФ, по-видимому, очень незначительна.

Исследование патматериала и внутренних органов от диких кабанов

Для многих инфекционных заболеваний свиной дикие кабаны рассматриваются как природный резервуар и потенциальный источник инфекции. С целью изучения распространения ЦВС-инфекции в дикой фауне был исследован патологический материал от диких кабанов, павших или отстрелянных с диагностической целью во Владимирской, Московской и Тверской областях.

Методом мПЦР ЦВС-2 выявили у кабанов в семи из четырнадцати обследованных охотохозяйств. Необходимо отметить, что у животных не наблюдалось патологоанатомических изменений, характерных для СМЮ или комплекса респираторной патологии, то есть имело место бессимптомное вирусоносительство.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что ЦВС-2 распространён в популяции диких кабанов на территории России, и эти животные могут являться природным резервуаром возбудителя цирковирсной инфекции свиной.

Исследование на наличие цирковирусов свиной клеточных культур, применяющихся в ФГУ ВНИИЗЖ

Цирковирусы свиной способны инфицировать различные типы клеточных культур. Применение контаминированных вирусом культур клеток для изготовления живых аттенуированных вакцин представляет потенциальную опасность для свиноводства, так как может приводить к инфицированию цирковирусами вакцинируемых животных.

В связи с этим используемые в ФГУ ВНИИЗЖ клеточные культуры исследовались на наличие контаминации цирковирусами свиной. В результате проведенных исследований установили, что пять из семи исследованных образцов культур клеток СПЭВ и РК-15 контаминированы цирковирусом свиной первого типа. Несмотря на то, что описана способность ЦВС-1 реплицироваться в клетках почки африканской зелёной мартышки, все протестированные нами образцы клеток Vero не содержали этот вирус.

Все тестируемые образцы культур клеток оказались свободными от ЦВС-2.

Секвенирование и филогенетический анализ российских изолятов ЦВС-2

Одной из задач наших исследований было изучение генетического разнообразия вируса, циркулирующего на территории России.

Методом нуклеотидного секвенирования была определена первичная структура ORC2 одиннадцати изолятов ЦВС-2 от домашних свиной и семи изолятов от диких кабанов, выделенных в различных хозяйствах РФ в 2000-2006 гг. Филогенетический анализ установленных последовательностей проводили с использованием программы SEQPROGS. При проведении сравнительного анализа использовали имеющиеся в информационной системе GenBank последовательности гена ORC2 цирковирусов, выделенных в различных регионах планеты.

Дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения изолятов ЦВС-2, представлена на рисунке 5. Из нее видно, что ЦВС-2 отличается большим генетическим разнообразием, и изоляты ЦВС-2, выделенные в

различных регионах мира. образуют несколько генетических групп (кластеров). Охарактеризованные нами российские изоляты оказались представленными сразу в нескольких кластерах.

Примечательно, что все российские изоляты от домашних свиней были близки в филогенетическом отношении к изолятам, выделенным на территории Западной Европы и Канады. Близкое генетическое родство российских и зарубежных изолятов, вероятно, объясняется тем, что в Россию завозят племенных животных из разных стран мира.

В близком филогенетическом родстве с изолятами от домашних свиней находились несколько изолятов, выделенных от кабанов (Истринский/каб/05, Талдомский/каб/05, Конаковский/каб/05), что может объясняться передачей вируса от домашних животных диким. В то же время изоляты Волоколамский/каб/05, Суздальский/каб/05, Кимрский/каб/05 и Покровский/каб/05, также выделенные от диких свиней, образовали обособленные кластеры. Не было обнаружено зависимости между географическим происхождением изолятов от диких кабанов и их принадлежностью к тому или иному кластеру. Изоляты из двух соседних районов (Кимрский/каб/05 и Конаковский/каб/05) представляли разные генетические группы, и, наоборот, изоляты из разных областей (Волоколамский/каб/05 и Суздальский/каб/05) принадлежали к одному кластеру.

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что в российской популяции диких кабанов циркулируют циркуловирусы различного происхождения: некоторые изоляты, вероятно, характерны именно для дикой фауны, тогда как другие были привнесены в нее от домашних свиней.

Смена штаммов ЦВС-2 в хозяйствах - еще один факт, установленный в ходе филогенетического анализа. Изоляты, выделенные в двух свиноккомплексах Вологодской области (Надеево 2003, Ботово/2000) соответственно в 2000 и 2003 гг., принадлежали к одной геногруппе, а изоляты

2005 и 2006 гг. (Ботово/2005, Надево/2006) из этих же хозяйств - к другой группе (рисунок 5).

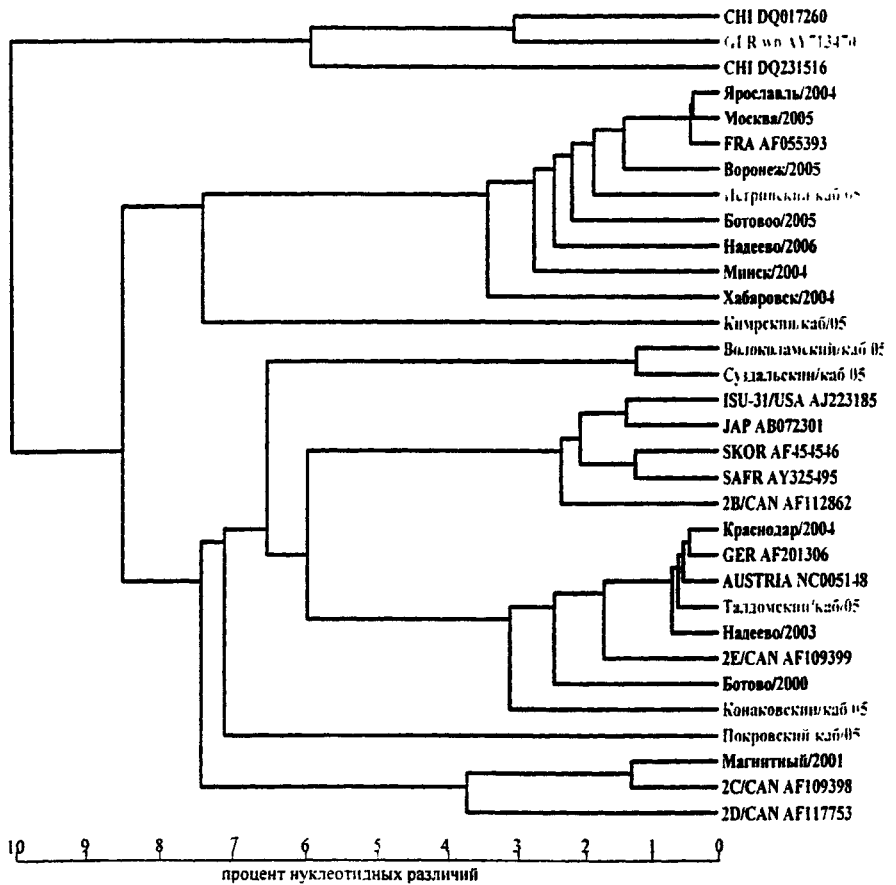


Рис. 5. Дендрограмма, отражающая уровень гомологии нуклеотидных последовательностей гена *ORC2* изолятов ЦВС-2, выделенных от домашних свиней и диких кабанов (каб).

Генетические исследования цирковирусов свиней проводятся не только с целью установления уровня сходства или различия между изолятами из разных географических регионов, но и для того, чтобы определить, существуют ли отличия на уровне генома между изолятами, выделенными от больных животных, и изолятами от клинически здоровых свиней. Большинство

исследователей приходит к выводу, что нет существенных генетических отличий между изолятами ЦВС-2, полученными от СМЮ положительных и СМЮ отрицательных (клинически здоровых) свиней, а клинические проявления ЦВС-инфекции зависят не от мутаций в геноме вируса, а от так называемых "дополнительных факторов", необходимых для развития СМЮ.

Проведенный нами генетический анализ российских изолятов ЦВС-2 также позволяет сделать заключение об отсутствии генетических маркеров вирулентности ЦВС-2, так как многие изоляты вируса, выделенные от больных и клинически здоровых животных, были генетически близки между собой.

Таким образом, в результате проведённого филогенетического анализа нами было установлено большое генетическое разнообразие российских изолятов ЦВС-2, выделенных от домашних свиней и диких кабанов: отсутствие зависимости между принадлежностью ЦВС-2 к тому или иному генетическому кластеру и географическому происхождению изолята. Кроме того показано, что в хозяйствах может происходить смена штаммов ЦВС-2. Принципиальные отличия на уровне генома между изолятами ЦВС-2 от клинически больных и клинически здоровых животных отсутствуют.

Получение рекомбинантного капсидного белка ЦВС-2 в системе экспрессии *E. coli*

Диагностика ЦВС-инфекции может осуществляться не только путем обнаружения вируса в органах и тканях свиней, но и определением антител к нему в крови животных, причем обнаружение антител имеет преимущество при проведении массовых исследований. В связи с этим одна из целей нашей работы состояла в разработке иммуноферментной тест-системы для выявления антител к циркулирующему свиней типа 2. Поскольку данный вирус плохо размножается в культурах клеток, в качестве антигена для ИФА использовали рекомбинантный капсидный белок ЦВС-2.

Схема конструирования плазмиды, экспрессирующей рекомбинантный белок ЦВС-2, показана на рисунке 6.

геном цирковируса свиной типа 2

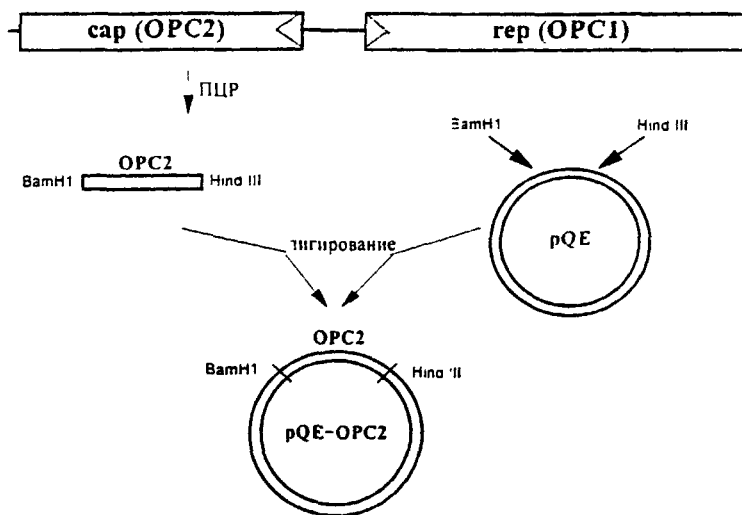


Рис. 6. Схема клонирования гена ORC2 цирковируса свиной типа 2 в экспрессирующую плазмиду pQE

ДНК ЦВС-2 выделяли из 10% суспензии лимфоузлов поросенка с признаками СМЮ. Ген, кодирующий капсидный белок вируса, амплифицировали методом ПЦР, в реакции использовали праймеры, в структуру которых были заложены сайты рестрикции Bam HI и Hind III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликон клонировали в экспрессирующий плазмидный вектор pQE.

В результате трансформации рекомбинантной плазмидой компетентных клеток M15 E.coli получили клоны, экспрессирующие структурный белок ЦВС-2, содержащий на N-конце шесть остатков гистидина. Молекулярная масса рекомбинантного белка соответствовала расчётной (рисунок 7). Из клонов, экспрессирующих белок ЦВС-2, выделили рекомбинантные плазмиды и проверили методом нуклеотидного секвенирования на отсутствие нуклеотидных замен и сдвигов в рамке считывания, приводящих к изменению аминокислотного состава рекомбинантного белка.

Экспрессию рекомбинантного белка проводили в течение 4 часов путем внесения в культуру *E.coli* ИПТГ в концентрации 0,2 мМ. Очистку рекомбинантного белка осуществляли методом металл-хелатной хроматографии с применением Ni-NTA агарозы в соответствии с инструкцией производителя («Qiagen»). Выход очищенного белка со 100 мл культуры *E.coli* достигал 1,4 мг.

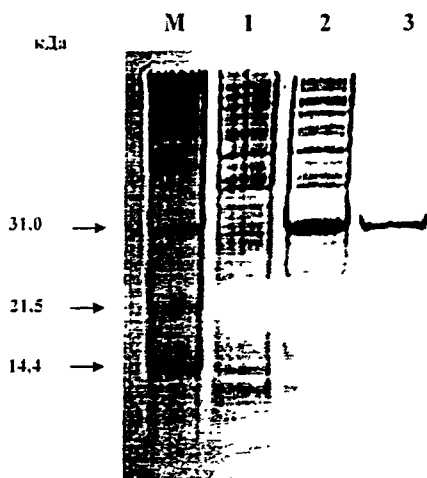


Рис. 7. Электрофоретический анализ рекомбинантного белка ЦВС-2 в 12%-м полиакриламидном геле

Примечание: М - маркер (кДа: 97,5; 66,2; 55,0; 42,7; 40,0; 31,0; 21,5; 14,4);

1 – белки *E.coli* до индукции;

2 – белки *E.coli* через 4 часа после индукции;

3 – очищенный рекомбинантный белок ЦВС-2

Определение антигенной активности и специфичности рекомбинантного белка

Антигенную активность белка проверяли в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками. В качестве контрольных использовали положительную и отрицательную сыворотки, проверенные в ИФА коммерческого набора «Ingesim circovirus IgG /IgM» (Ingenasa, Испания). Результаты проверки антигенной активности рекомбинантного белка отражены на рисунке 8. Концентрация рекомбинантного белка, при которой оптическая

плотность положительного контроля в 2 раза превышала оптическую плотность отрицательного контроля, составляла 0,5469 мкг/мл.

Антигенную специфичность рекомбинантного белка проверяли в непрямом варианте ИФА с сыворотками крови свиней, содержащими антитела к вирусам классической чумы свиней, болезни Ауески, репродуктивно-респираторного

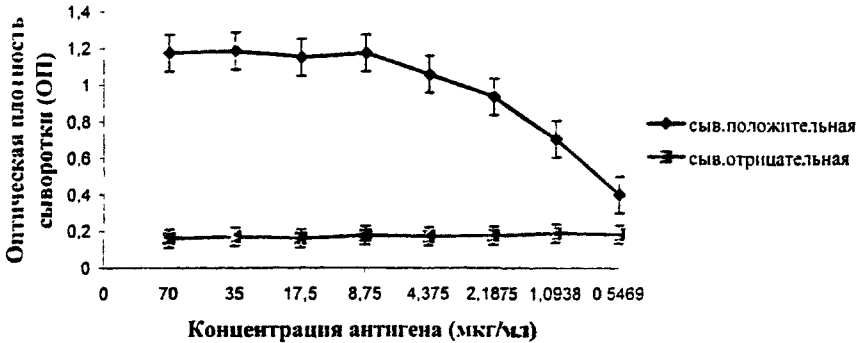


Рис. 8. Антигенная активность рекомбинантного белка в непрямом ИФА с контрольными сыворотками

синдрома свиней. *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Pasteurella multocida*, трансмиссивного гастроэнтерита и парвовирусу свиней. Активность антигена с гетерогенными сыворотками не превышала фоновый уровень, полученный в реакции с отрицательной сывороткой.

Разработка непрямого варианта ИФА

При разработке непрямого варианта ИФА были решены следующие задачи: определено рабочее разведение антигена, отработаны условия сенсibilизации лунок микропанелей (состав буферов для сенсibilизации и блокирования планшетов), установлены оптимальное рабочее разведение сывороток, позитивно-негативный порог реакции, допустимые величины оптических плотностей отрицательных и положительных сывороток, показатель воспроизводимости реакции (коэффициент вариации).

Критерии реакции, установленные в результате проведенных исследований, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Установленные показатели ИФА для обнаружения антител к ЦВС-2

Показатели	Значение
Рабочее разведение антигена	1:200 (7мкг/мл)
Рабочее разведение сывороток крови	1:40
Условия сенсibilизации антигена	16-18ч 4°C в КББ
Срок хранения сорбированного антигена без снижения активности	не менее 12 мес
Позитивно-негативный порог	$0,15 > SP > 0,1$
Допустимые величины оптической плотности отрицательного контроля	0,102-0,142 ОЕ
Допустимые величины оптической плотности положительного контроля	0,871-1,141 ОЕ
Коэффициент вариации	7,9%

Для сравнения разработанного метода относительно референтной тест-системы 226 сывороток крови свиней исследовали на наличие антител к ЦВС-2 в непрямом варианте ИФА и в коммерческом наборе «Ingesim circovirus IgG IgM» (Ingenasa, Испания). Согласованность двух тестов определяли методом капа статистики. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Согласованность результатов двух иммуноферментных тест-систем при выявлении антител к ЦВС-2 в сыворотках крови свиней

Сравниваемые тест-системы	Результаты в наборе «Ingenasa»		Всего	Выявленная превалентность в непрямом ИФА
	положительно	отрицательно		
Результаты в непрямом ИФА ВШПЗЖ	положительно	125	0	125 (125-0)/226 =0,55
	отрицательно	60	41	
Всего	185	41		
Выявленная превалентность в наборе «Ingenasa»	(125-60)/226 =0,82	(0-41)/226 =0,18		226

Абсолютная согласованность результатов ИФА $(125-41) / 226 = 0,735$
 Случайная согласованность положительных результатов $0,82 \times 0,55 = 0,451$

Случайная согласованность отрицательных результатов $0.18 \times 0.45 = 0.081$

Обобщённая случайная вероятность согласованности результатов $0.451 \times 0.081 = 0.037$

Наблюдаемая согласованность результатов без учёта случайности $0.735 - 0.037 = 0.698$

Неслучайная максимально возможная согласованность методов $1 - 0.037 = 0.963$

k-критерий (капа-статистика): $0.698 / 0.963 = 0.72$

Значение капа интерпретировали следующим образом (Landis, Koch, 1977):

-очень хорошая согласованность параметров при значении капа	0.81-1.00
-хорошее	0.61-0.80
-умеренное	0.41-0.60
-слабое	0.21-0.40
-очень слабое	0.01-0.20
-незначимое	≤ 0

Полученное в нашем случае значение **k-критерия**, равное 0,72, свидетельствует о хорошей согласованности результатов двух тест-систем.

Применение разработанного непрямого варианта ИФА для изучения распространения ЦВС-2 в хозяйствах РФ

С применением разработанной иммуноферментной тест-системы исследовали более 2000 проб сывороток крови свиней из 60 свиноводческих хозяйств РФ. В 58 хозяйствах у свиней обнаружили антитела к ЦВС-2. В двух фермах антитела к вирусу не выявили, однако необходимо учитывать, что из этих хозяйств поступило всего несколько сывороток, причём только от свиноматок. Таким образом, результаты анализа сывороток крови подтвердили чрезвычайно широкое распространение цирковиральной инфекции свиней в хозяйствах России.

В неблагополучных по цирковиральной инфекции хозяйствах антитела к вирусу обнаружили у $2\% \pm 0,1\%$ поросят до приёма молозива, $5,1\% \pm 0,5\%$ поросят до 2-месячного возраста, $31,1\% \pm 5\%$ поросят в возрасте 2-4 мес., $42,2\% \pm 7\%$ 4-6-месячных поросят, $40,5\% \pm 6\%$ ремонтного молодняка и $23,4\% \pm 3\%$ взрослых животных (рисунок 9). Результаты ИФА по обнаружению антител к ЦВС-2 согласовывались с результатами ПЦР по выявлению вируса: максимальное количество положительных на ЦВС-2 проб в ПЦР приходилось на поросят заключительной стадии дорашивания или период откорма.

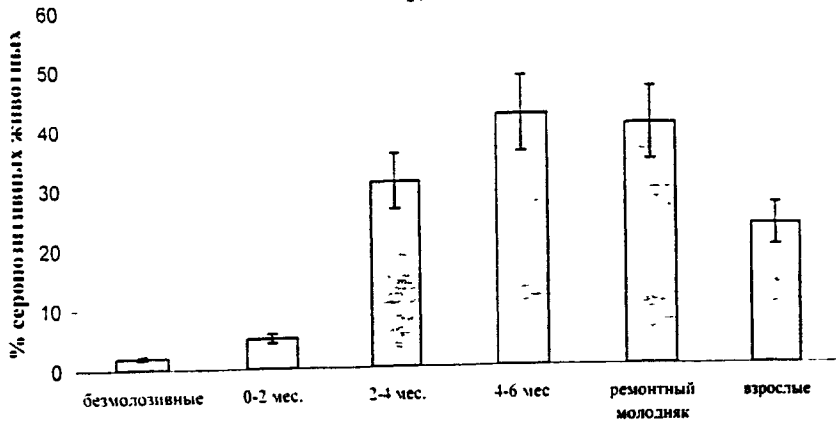


Рис. 9. Изменение количества серопозитивных в отношении ЦВС-2 свиней в зависимости от возраста

С использованием разработанной тест-системы проанализировали уровень антител к ЦВС-2 у 408 племенных животных, закупленных рядом российских хозяйств в Канаде, Польше и Дании. 38% импортных свиней были серопозитивны в отношении ЦВС-2.

При исследовании сывороток крови диких кабанов антитела к ЦВС-2 обнаружили у животных из различных регионов: от Владимирской и Московской областей до Приморского края РФ, что свидетельствует о широком географическом распространении ЦВС-2 в дикой фауне России.

Таким образом, в результате проведённых исследований были разработаны методы диагностики цирковиральной инфекции свиней: мультиплексная ПЦР для обнаружения и типирования цирковирусов и непрямой вариант ИФА для выявления антител к ЦВС-2 в крови животных. Применение разработанных методов в диагностических исследованиях позволило установить особенности клинического проявления и степень распространения цирковиральной инфекции в свиноводческих хозяйствах и дикой фауне РФ, определить генетическое разнообразие российских изолятов ЦВС-2, выявить культуры клеток, контаминированные ЦВС-1.

3. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод диагностики цирковиральной инфекции свиней, основанный на мультиплексной ПЦР и позволяющий в одной реакции обнаруживать и дифференцировать ЦВС-1 и ЦВС-2.
2. С использованием разработанного метода изучены особенности клинического проявления цирковиральной инфекции в хозяйствах РФ. Установлено, что ЦВС-2 ассоциирован в российских хозяйствах, главным образом, с респираторными болезнями поросят и СМНО. Определены другие инфекционные агенты, участвующие в развитии этих заболеваний. Показано, что роль ЦВС в репродуктивной и нервной патологиях свиней в российских хозяйствах незначительна.
3. Установлено, что ЦВС-2 распространён в российской популяции диких кабанов, и эти животные могут являться природным резервуаром вируса.
4. На наличие цирковирусов свиней исследованы культуры клеток, используемые в ФГУ "ВНИИЗЖ". Определены образцы культур клеток СПЭВ и РК-15, контаминированные цирковирусом свиней типа 1. Показано, что все исследованные культуры клеток свободны от ЦВС-2.
5. Методом нуклеотидного секвенирования определена первичная структура гена ОРС2 18 российских изолятов ЦВС-2, выделенных от домашних свиней и диких кабанов. Филогенетический анализ установленных последовательностей выявил большое генетическое разнообразие вируса, циркулирующего на территории РФ. Не выявлено зависимости клинических проявлений болезни от первичной структуры генома вируса.
6. Проведено молекулярное клонирование и экспрессия в *E. coli* гена ОРС2. получен рекомбинантный капсидный белок цирковируса свиней типа 2.
7. На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к ЦВС-2 в сыворотках крови свиней. Установлена хорошая согласованность ($k=0.72$) результатов, полученных в

разработанной тест-системе и коммерческом наборе "Ingezim circovirus IgG IgM" (Ingenasa, Испания).

8. Результаты применения разработанной иммуноферментной тест-системы в серомониторинге цирковирусной инфекции свиней свидетельствуют об очень широком распространении ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах и дикой фауне России.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются:

«Методика обнаружения и типирования цирковирусов свиней с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции»;

«Методика обнаружения антител к цирковирусу свиней типа 2 в непрямом варианте иммуноферментного анализа».

Методики комиссионно испытаны, одобрены Учёным советом, утверждены директором ФГУ ВНИИЗЖ и используются для диагностики цирковирусной инфекции свиней.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Щербаков А.В., Ковалишин В.Ф., Тимина А.М., Яковлева А.С. Генодиагностика инфекционных болезней свиней // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. тр. 5-ой Всерос. научно-практ. конф. – М., 2004. – Т. 2. – С. 243-247.
2. Кукушкин С.А., Ковалишин В.Ф., Долганова Е.К., Тетерин И.А., Тимина А.М., Каньшина А.В., Шевцов А.А., Пузанкова О.С., Потехин А.В. Диагностика и профилактика инфекционных болезней свиней в современных условиях // Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: Пробл. агроэкономики, вет. медицины и биотехнологии в жив-ве. – Иваново, 2005. – Т. 2 – С. 119-120.

3. Кукушкин С.А., Байбииков Т.З., Ковалишин В.Ф., Тимина А.М., Яковлева А.С. Проллиферативно-некротизирующая пневмония свиней // Ветеринария. - 2005. - № 9. С. 17-20.
4. Ковалишин В.Ф., Щербаков А.В., Тимина А.М., Яковлева А.С., Чельшева М.В. Современные методы диагностики болезней свиней инфекционной этиологии // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ветеринарне забезпечення свинарства: сучасний стан і шляхи розвитку» - Харків, 2005. - С. 78-84.
5. Кукушкин С.А., Байбииков Т.З., Тимина А.М., Ковалишин В.Ф., Тетерин И.А. Новая инфекционная патология - пролиферативно-некротизирующая пневмония свиней // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ветеринарне забезпечення свинарства: сучасний стан і шляхи розвитку» - Харків, 2005. -С. 74-78.
6. Timina A.M., Kukushkin S.A., Baibikov T.Zh., Sherbakov A.V., Kovalishin V.F. Monitoring of porcine circovirus type 2 on pig farms of the Russian Federation // Proc. of the Int. Conf. on Animal Circoviruses and Associated Diseases / Queen's University, Belfast, Northern Ireland, UK, 2005.-P. 79.
7. Timina A.M., Kovalishin V.F., Sherbakov A.V. Diagnostics of PCV-2 infection in Russia // Proc. of the Int. Conf. on Animal Circoviruses and Associated Diseases / Queen's University, Belfast, Northern Ireland, UK, 2005.-P. 98.

20064
14242

14242