

Битешова Э.Т., Абдрахманова Б.С., Мамбеталиев М.

**КАЗАХСТАНДЫН ТҮШТҮК РЕГИОНДОРУНДАГЫ ЧОЧКОЛОРДУН
ЦИРКОВИРУС ИНФЕКЦИЯСЫНЫН КОЗГОГУЧУН БӨЛҮП АЛУУ**

Битешова Э.Т., Абдрахманова Б.С., Мамбеталиев М.

**ВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ
В ЮЖНЫХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА**

E.T. Biteshova, B.S. Abdrakhmanova, M. Mambetaliev

**ISOLATION OF AGENT CAUSING CIRCOVIRUS INFECTION OF SWINE IN THE
SOUTHERN REGIONS OF KAZAKHSTAN**

УДК: 619:616.98:578.636.4

Бул иште Республиканын түштүк региондорундагы чочко чарбаларынан чочколордун цирковирустук инфекция (ЧЦИ) бар деп шектелип алынган патологиялык материалдарды вирусологиялык изилдөөлөрүнүн жыйынтыктары келтирилди. Мында чочколордун цирковирустук инфекция вирусун сезгич келген клеткалардын культуураларынын түрлөрү аныкталды жана ПЦР-РВ вирусунун идентификациясы жүргүзүлдү.

Негизги сөздөр: цирковирус, цирковирустук инфекция, биоматериалдар, суспензия.

В данной работе представлены результаты вирусологических исследований патологических материалов, доставленных из свиноводческих хозяйств южных регионов республики с подозрением на цирковирусную инфекцию свиней (ЦИС). При этом были определены чувствительные виды культур клеток для вируса цирковирусной инфекции свиней и проведена идентификация вируса в ПЦР-РВ.

Ключевые слова: цирковирус, цирковирусная инфекция, биоматериалы, суспензия.

The results of the virology researches of pathological materials delivered from pig factories of the southern regions of republic Kazakhstan with suspicion on circovirus infection of swine (CIS) are presented in this work. The sensitive types of cell cultures for circovirus infection of swine virus were determined and virus identification in PCR-RT is provided.

Key words: circovirus, circovirus infection, biomaterials, suspension.

Введение

В связи расширением экономических, торговых и туристических связей между государствами, возросшее значение различных транспортных средств существенно повышает возможность заноса особо опасных болезней свиней на территорию Казахстана.

Цирковирусная инфекция свиней продолжает являться главной проблемой для многих свиноферм по всему миру [1]. Идентифицировано три генотипа ЦВС 2, которые были названы ЦВС 2а, ЦВС 2б и ЦВС 2с [2]. В 2005г. в Северной Америке был идентифицирован генотип ЦВС2б и затем количество зарегистрированных случаев цирковирусной инфекции свиней возросло [3]. Болезнь распространена в странах с развитым свиноводством (Германии, Кана-

де, США, Ирландии, Франции, Испании). Первой европейской страной, где регистрировалась ЦИС была Франция. В последующие годы цирковирус получил широкое распространение в свиноводческих хозяйствах стран Северной Америки, Европы и Азии, где от больных поросят был изолирован и идентифицирован вирус цирковирусной инфекции свиней 2 вида (PCV-2). Однако следует отметить, что впервые цирковирусная инфекция свиней первого вида (PCV-1) была обнаружена и описана еще в 1974 году как пикорнавирусообразный контаминант хронически инфицированной перевиваемой линии клеток почки поросенка (ЖК-15) [4]. В России ЦВС-2 был впервые обнаружен в 2000 году [5].

В настоящее время в Казахстане нет эпизоотологических данных по ЦИС, вследствие отсутствия диагностических средств. Однако в отдельных свиноводческих хозяйствах республики проводится специфическая профилактика против данной инфекции, что свидетельствует о циркуляции вируса среди свиноголовья республики.

Целью исследования являлось выделение вируса ЦИС из органо-тканевых материалов путем культивирования в чувствительной культуре клеток с последующей идентификацией его в ПЦР-РВ.

Материалы и методы

В работе использованы пробы патологических и клинических материалов, полученных от больных, павших и новорожденных поросят с подозрением на ЦИС из Алматинской и Жамбылской областей.

Для выделения изолятов вируса циркулирующих среди свиней вышеуказанных областей были использованы перевиваемые линии клееток MARC-145 (клоновый вариант клеток почки эмбриона макаки-резуса МА-104), СПЭВ и РК-15, выращенные в пробирках.

Для культивирования перевиваемых линий культур клеток использовали ростовую среду на основе питательной среды Игла по стандартной прописи с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Промывку сформированного клеточного монослоя осуществляли стерильным раствором Хенкса.

Также были использованы следующие реактивы и растворы:

- антибиотики: натриевая соль бензилпенициллина, гентамицина сульфат, стрептомицина сульфат;
- 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор);
- 96% этиловый спирт;
- 6% раствор L-глутамина.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с pH 6,5 и удельной электропроводностью 0,5 S/cm.

Диагностические тест-системы:

- Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Antigen detection ELISA фирмы Bio Note, (Корея);
- Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) PCR Real-Time Detection Kit фирмы Bio Note, (Корея);

Методика

Вирусовыделительные работы проводили по общепринятой методике. Для получения органо-тканевых суспензий 1 г материала измельчали ножницами, гомогенизировали, добавляли постепенно 10 мл физиологического раствора. Суспензию очистили от крупнодисперсных элементов путем центрифугирования при небольших скоростях (3000-об/мин) в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбирали в стерильную пробирку и в полученную 10% суспензию добавляли антибиотики широкого спектра действия: пенициллина 200 ЕД/мл, стрептомицина сульфат 0,2 г/мл и гентамицина сульфат 0,75 мг/мл. Затем для выхода вируса из клетки, суспензию трижды замораживали-оттаивали при минус 40 °С, разрушая тем самым клеточную стенку, центрифугировали при 3000-об/мин в течение 30 мин и надосадок использовали для вирусологических исследований.

Для выделения вируса ЦИС использовали 48-72ч монослой культуры перевиваемых линий клеток MARC-145, СПЭВ и РК-15, выращенных в пробирках. Перед заражением культур клеток ростовую среду сливали, монослой промывали стерильным раствором Хенкса. Затем культуры клеток заражали суспензиями, приготовленными из доставленных патологических материалов. Для адсорбции патогена

пробирки с зараженными культурами клеток помещали в термостат на 1 ч. После контакта объем подерживающей среды Игла в пробирках довели до 1мл и инкубировали при температуре 37⁰С. Ежедневно за пробирками вели наблюдение в течение 3-7 сут (световая микроскопия). О присутствии вируса в исследуемых пробах судили по проявлению деструктивных изменений в монослое культур клеток. Пробирки с ярко выраженными цитопатическими изменениями замораживали при температуре минус 40⁰С. Инфицированные пробирки с культурой клеток без деструктивных изменений до проведения следующего пассажного уровня хранили при низкой температуре.

Для проведения последовательных «слепых» пассажей исследуемую суспензию предыдущего пассажа трижды замораживали-оттаивали при минус 40⁰С, разрушая тем самым клеточную стенку для выхода вируса, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и надосадок использовали для проведения следующего пассажного уровня. При этом по 5-10 пробирок с перевиваемыми линиями клеток MARC-145, СПЭВ и РК-15 инфицировали исследуемыми суспензиями предыдущего пассажа в объеме по 0,2 мл.

Для выявления ДНК вируса в культуральных суспензиях пассажных материалов использовали ПЦР-РВ (Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) PCR Real-Time Detection Kit фирмы Bio Note, (Корея), постановку которого осуществляли согласно рекомендациям производителя.

Выполнение вирусологических работ проводили в вирусологических боксах с соблюдением правил биологической безопасности.

Результаты и обсуждение

Для проведения вирусологических исследований по выделению и идентификации возбудителя ЦИС были использованы объединенные материалы внутренних органов павших и вынужденно убитых животных с подозрением на ЦИС. Перечень биоматериалов, использованных для вирусологических исследований, представлен в таблице 1.

Таблица 1

Перечень биоматериалов, использованных для вирусологических исследований

Место выделения	Номер и возраст животного	Порядковые номера проб	Наименование биоматериалов
Алматинская область, хозяйство №1	подсвинка №3, 3 мес возраста	1	суспензии внутренних органов
	поросята (павшие), 1 мес возраста	2	суспензии внутренних органов
		3	суспензии внутренних органов
Алматинская область, хозяйство №2	поросенок №1 (слаборожденный)	4	суспензии внутренних органов
	поросенок №2 (слаборожденный)	5	суспензии внутренних органов
	поросенок №3 (слаборожденный)	6	суспензии внутренних органов
	поросенок 3 дневного возраста (павший)	7	кровь
		8	суспензии внутренних органов
Алматинская область, хозяйство №3	поросенок №1, 40 сут возраста	9	кровь
		10	суспензии внутренних органов
	поросенок №2, 40 сут возраста	11	суспензии внутренних органов

	подсвинка №3, 3 мес возраста	12	суспензии внутренних органов
Жамбылская область, ст. Отар	подсвинка №2, 3 мес возраста	13	суспензии внутренних органов
	подсвинка №1, 3 мес возраста	14	суспензии внутренних органов

Для выделения вируса ЦИС из патологических материалов, доставленных из Алматинской и Жамбылской областей, инфицировали приготовленными суспензиями этих материалов в объеме по 0,2 мл 48-72 ч пробирочные культуры перевиваемых линий клеток *MARC-145*, СПЭВ и РК-15. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Культивирование суспензии биологических материалов, доставленных из свиноводческих хозяйств в монослое культур клеток для выделения возбудителя ЦИС

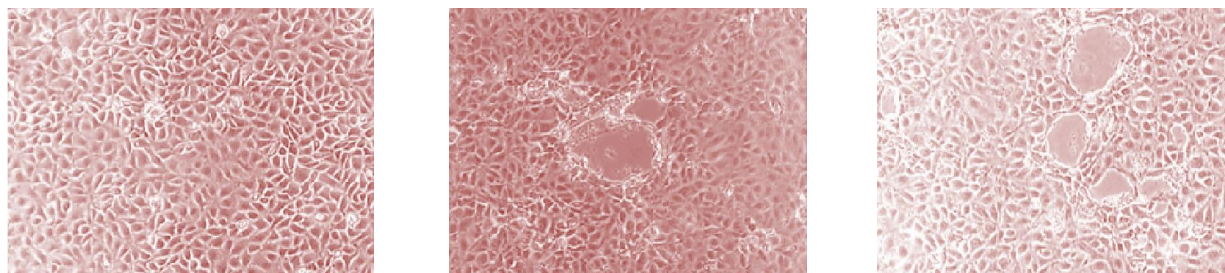
Место выделения	Номер и возраст животного	Порядковые номера проб	Наименование использованного биоматериала	Наименование культуры клеток и пассажный уровень								
				MARC-145			РК-15			СПЭВ		
				I	II	III	I	II	III	I	II	III
Алматинская область, хозяйство №1	подсвинка №3, 3 мес возраста	1	суспензия внутренних органов	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Алматинская область, хозяйство №1	поросята (павшие), 1 мес возраста	2	суспензия внутренних органов	-	+	+	-	+	+	-	-	+
		3	суспензия внутренних органов	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Алматинская область, хозяйство №2	поросенок №1 (слаборожденный)	4	суспензия внутренних органов	-	+	+	-	+	+	-	-	+
	поросенок №2 (слаборожденный)	5	суспензия внутренних органов	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	поросенок №3 (слаборожденный)	6	суспензия внутренних органов	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	поросенок №4, 3 дневного возраста (павший)	7	кровь	-	-	-	-	+	+	-	-	-
8		суспензия внутренних органов	-	+	+	-	+	+	-	-	+	
Алматинская область, хозяйство №3	поросенок №1, 40 сут возраста	9	кровь	-	-	+	-	+	+	-	-	+
		10	суспензия внутренних органов	-	-	+	-	+	+	-	-	+
	поросенок №2, 40 сут возраста	11	суспензия внутренних органов	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	подсвинка №3, 3 мес возраста	12	суспензия внутренних органов	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Жамбылская область, ст. Отар	подсвинка №2, 3 мес возраста	13	суспензия внутренних органов	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	подсвинка №1, 3 мес возраста	14	суспензия внутренних органов	-	+	+	-	-	+	-	-	-

Примечания:

- 1 «-» - отсутствие деструктивных изменений в монослое культур клеток
2 «+» - наличие деструктивных изменений в монослое культур клеток

Как видно из данных таблицы 2, деструктивные изменения обнаруживаются на разных пассажных уровнях в монослоях во всех испытанных видах культур клеток. Однако наиболее чувствительными к данному патогенному агенту были культуры клеток *MARC-145* и PK-15, где проявление деструктивных изменений обнаруживалось у отдельных проб с 1 пассажа и к 3 пассажному уровню изменения отмечались у 98 % проб.

При размножении, вирус в культурах клеток вызывал образование деструктивных изменений в клетках, при отсутствии таковых в контроле. Первые изменения обнаруживали на 2 сутки после заражения. В отдельных участках монослоя клетки сильно преломляли свет, на 4 сутки после посева, клетки округлялись и отслаивались от стекла с образованием пустот в монослое культуры клеток (рисунок а, б).



контроль культуры клеток

а – ЦПД вируса на 2 сут

б - ЦПД вируса на 3-4 сут

Рисунок. Проявление деструктивных изменений в перевиваемой линии культуры клеток *MARC-145*, инфицированной суспензиями органо-тканевых материалов, полученных от павших и вынужденно убитых свиней с подозрением на ЦИС.

Отдельные пробы культур клеток с деструктивными изменениями проверена в ПЦР-РВ на обнаружение ДНК вируса ЦИС. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Постановка ПЦР-РВ на наличие ДНК вируса ЦИС в пробах, полученных при проведении пассажных работ в культурах клеток

Место выделения	Номер и возраст животного	Порядковые номера проб	Наименование исследованного материала	Результаты ПЦР
Алматинская область, хозяйство №1	подсвинка №3, 3 мес возраста	1	культуральная суспензия внутренних органов	положительный
	поросята (павшие), 1 мес возраста	2	культуральная суспензия внутренних органов	положительный
		3	культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный
Алматинская область, хозяйство №2	поросенок №1 (слаборожденный)	4	культуральная суспензия внутренних органов	положительный
	поросенок №2 (слаборожденный)	5	культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный
	поросенок №3 (слаборожденный)	6	культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный
	поросенок 3 дневного возраста (павший)	7	культуральная суспензия кровь	отрицательный
8		культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный	
Алматинская область хозяйство №3	поросенок №1, 40 сут возраста	9	культуральная суспензия кровь	отрицательный
		10	культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный
	поросенок №2, 40 сут возраста	11	культуральная суспензия внутренних органов	отрицательный
подсвинка №3, 3 мес возраста	12	культуральная суспензия внутренних органов	положительный	
Жамбылская область, ст. Отар	подсвинка №2, 3 мес возраста	13	культуральная суспензия внутренних органов	положительный
	подсвинка №1, 3 мес возраста	14	культуральная суспензия внутренних органов	положительный
тест-система		15	pos (положительный контроль)	положительный
тест-система		16	neg (отрицательный контроль)	отрицательный

Данные таблицы 3 показывают, что из 14 исследованных культуральных пассажных материалов в 6 образцах обнаружены ДНК вируса ЦИС 2, которые относятся к 3 обследованным хозяйствам Алматинской области и частному владельцу из ст. Отар Жамбылской области.

Таким образом, в исследованных материалах имеется биологический агент, который при инфицировании культур клеток вызывает деструктивные изменения монослоя, схожая описанию Малоголовкина А.С. [6] при культивировании вируса ЦИС. Исследование в ПЦР-РВ полученных нами культуральных суспензий подтверждает специфичность деструктивных изменений в монослое культуры клеток наличием в них ДНК вируса цирковирусной инфекции свиней.

Заключение

Полученные результаты вирусологических исследований патологических материалов из хозяйств Алматинской и Жамбылской областей позволили сделать следующие выводы:

1. Культивирование биологических материалов, доставленных из свиноводческих хозяйств показало, что из испытанных культур клеток наиболее чувствительными для вируса ЦВС являются MARC-145 и РК-15;

2. Патогеном вызывающим деструктивные изменения в монослоях испытанных культур клеток является вирус ЦИС, который был идентифицирован в ПЦР-РВ;

3. По результатам проведенных исследований установлено, что в хозяйствах Алматинской и Жамбылской областей среди свиноголовья циркулирует вирус ЦИС-2.

Литература:

1. Huang Y.L., Pang V.F., Pan C.H., Chen T.H., Jong M.H., Huang T.S., Jeng C.R. Development of a reverse transcription multiplex real-time PCR for the detection and genotyping of classical swine fever virus // *J Virol Methods*. - 2009. - 160. - P. 111-118.
2. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotype with time // *Vet Microbiol.* - 2008. - 128. - P. 56-64.
3. Gerbera P.F., Johnsona J., Shena H., Striegelc D., Xiaoa C.T., Halbura P.G., Opriessniga T. Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs // *Res Vet Sci.* - 2013. - 95(2). - P. 775-781.
4. I. Tischer *et al.*, «Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines», *Zentralbl. Bakteriol.Hyg.Otg.A.* - 226(2):153-167 (1974).
5. Бутенков А.И. Патогенетическое обоснование развития и прогнозирования тяжести течения цирковирусной инфекции у поросят: автореф. дис. докт. вет. наук. - Новочеркасск, 2010.
6. Малоголовкин Александр Сергеевич. Биологические и генетические характеристики цирковирусов свиней: диссертация... кандидата биологических наук: 03.00.06, 03.00.23/Малоголовкин Александр Сергеевич.

Рецензент: к.биол.н. Султанкулова К.Т.