

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А.А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ,
Л.В. ШЕВЧЕНКО, Г.А. ДЖАИЛИДИ,
Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ**

ДИАГНОСТИКА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Учебное пособие

г. Краснодар, 2013

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А. А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ, Л.В. ШЕВЧЕНКО,
Г.А. ДЖАИЛИДИ, Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ**

ДИАГНОСТИКА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Учебное пособие

**Для студентов высших учебных заведений факультета
ветеринарной медицины по направлению подготовки
«Ветеринария»**

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:616.98-07:578.833.314(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев
Учебное пособие «Диагностика классической чумы свиней».
Краснодар: КубГАУ, 2013. 18 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителя классической чумы свиней; описаны вирусологические, биологические и серологические методы диагностики и дифференциальной диагностики заболевания.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Лысенко А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета ветеринарной медицины КубГАУ.

Куриннов В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины КубГАУ протокол №3 от 19 ноября 2012 года.

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

Диагностика классической чумы свиней

Классическая чума свиней (КЧС) - высококонтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, поражением кровеносной и кроветворной систем, крупозным воспалением легких и крупозно-дифтерическим воспалением толстого кишечника. Группа А по данным МЭБ.

К ВКЧС восприимчивы домашние свиньи всех пород и возрастных групп, особенно чистопородные, а также дикие кабаны.

Болезнь регистрируется главным образом в Азии, Центральной и Южной Америке, а также в некоторых регионах Европы и Африки.

Вирус чумы свиней относится к семейству *Flaviviridae*, род *Pestivirus*. Вирусную природу КЧС установили в 1908 г. Швейнитц и Дорсе.

Антигенная вариабельность ВКЧС не доказана. По вирулентности различают А-, В- и С-варианты вируса. В группу А входят вирулентные эпизоотические штаммы, вызывающие у свиней всех возрастов остро протекающую болезнь. Вирусы подгруппы В вирулентны только для поросят и при циркуляции в стаде вызывают атипичную или хроническую чуму. Подгруппа С – американский слабовирулентный шт. 331. Установлено одностороннее родство между ВКЧС и вирусом диареи КРС: АТ к вирусу диареи КРС нейтрализуют ВКЧС, но АТ к ВКЧС не нейтрализуют вируса диареи. В сыворотке крови свиней-реконвалесцентов обнаруживают ВНА, ПА и КСА.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Эпизоотологические и патологоанатомические данные зависят от восприимчивости свиней, вирулентности штамма и комплекса мероприятий по профилактике КЧС.

Если в очаге штамм вируса вирулентный, поголовье свиней не иммунное, то болезнь характеризуется высокой контагиозностью, большей смертностью, гипертермией, геморрагическими поражениями кожного покрова, признаками поражения органов ЖКТ и ЦНС. Обращают внимание выраженный геморрагический диатез в различных органах, мраморность лимфоузлов, инфаркты селезенки, кровоизлияния в почках на фоне их анемии, катарально-

геморрагический гастроэнтерит, лимфоцитарный энцефаломиелит. Однако частая вакцинация свиней против чумы создает иммунный фон, влияющий на симптомы болезни и характер патоморфологических изменений. При хроническом течении характерными изменениями являются очаговый дифтеритический налет (бутоны), коричневая экзема, фибринозный плеврит и перикардит, некроз миндалин. Хроническая болезнь часто протекает на фоне других инфекций. Правильный диагноз может быть поставлен только лабораторными исследованиями.

Экспресс-методы обнаружения вируса КЧС. Рекомендована дифференциация пестивирусов с использованием ДНК-зонда на ВКЧС. В качестве гибридационного зонда используют комплементарную ДНК (меченую ^{32}P) к участку гена белка Р125. Для быстрого обнаружения ВКЧС в тканях с помощью ПЦР из образцов тканей животных фенольным дом выделяют препараты РНК, подвергают обратной транскрипции и амплифицируют ПЦР. Используемые "гнездовые" праймеры позволяют амплифицировать разные изоляты ВКЧС. ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет дифференцировать различные пестивирусы. Предложен вариант ПЦР для выявления ВКЧС с использованием 4-х праймеров для амплификации фрагментов гена белка

Е-1. Чувствительность метода составляет 10 ТЦД₅₀.

Выделение вируса. Для выделения вируса берут пробы крови, кусочки селезенки, миндалин, лимфоузлов, грудной кости, почек и легких от 2-3 животных в первые 2ч после гибели или убоя больных в атональном состоянии. Материал отбирают в стерильные флаконы, закрывают резиновыми пробками, флаконы обрабатывают снаружи 5%-ным р-ром хлорамина или осветленным 20%-ным р-ром хлорной извести, обертывают марлей, смоченной дезинфицирующим р-ром, и помещают в полиэтиленовый пакет. Взятый патматериал помещают в термос со льдом, опечатывают и отправляют с нарочным в лабораторию с сопроводительным документом. В лаборатории из каждой пробы готовят 20%-ную суспензию на 0,85%-ном р-ре NaCl, которую трижды замораживают и оттаивают, центрифугируют при 3-4 тыс. мин⁻¹ 20-30 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками 1ч при 37°C и используют для выделения вируса.

Выделение вируса в культуре клеток. Используют перевиваемую культуру клеток РК-15, выращенную на стеклянных пла-

стинках. На каждую пробу материала берут не менее 8 пробирок, в которые вносят по 0,4 мл исследуемого материала. Адсорбируют вирус 2 ч 137°C, затем его удаляют, клетки отмывают средой и заливают 2 мл поддерживающей среды с 2% сыворотки теленка. Для контроля качества культуры клеток оставляют 10 пробирок незаряженными. Инкубируют 24-96 ч. ВКЧС в культуре клеток РК-15 не вызывает, поэтому индикацию его проводят методом прямой ИФ. Через 24-96 ч после инокуляции пластинки с монослоем клеток извлекают из пробирок, подсушивают на воздухе и 10 мин фиксируют в холодном (4°C) ацетоне, подсушивают на воздухе и помещают их клетками вниз на капле ФИТЦ-Ig ВКЧС, нанесенного в рабочем разведении на предметные стекла. Препараты выдерживают во влажной камере 30 мин при 37°C, затем промывают в сосуде с 0,01 М ФСБ с рН 7,2-7,5 30-40 мин в темном месте, ополаскивают в дистиллированной воде, подсушивают на воздухе и заключают в забуференный глицерин (9 частей глицерина и 1 часть 0,01 М ФСБ с рН 7,5). Для этого на обезжиренное предметное стекло наносят каплю забуференного глицерина, помещают препарат клетками вниз и заливают края расплавленным парафином, Просматривают под люминесцентным микроскопом.

В инфицированных препаратах, обработанных ФИТЦ-Ig, АГ вируса обнаруживают по ярко-зеленому диффузному свечению цитоплазмы пораженных клеток, располагающихся группами, которые называют флюоресцирующими микробляшками. Через 24-48 ч в культуре клеток РК-15 наблюдают появление микробляшек. При их отсутствии в первом пассаже проводят 2-й и 3-й пассажи испытуемого материала с последующим ИФ через 24-96 ч.

Индикация и идентификация вируса. *Гистологические исследования.* Проводят с целью обнаружения специфических изменений нервных тканей. От павших или убитых свиней берут кусочки полушария головного мозга, мозжечка, аммоновых рогов, спинного мозга в различных участках. Гистологические препараты окрашивают гематоксилинэозином. В большинстве случаев (70-93%) в ЦНС обнаруживают негнойный лимфоцитарный энцефаломиелит, характеризующийся периваскулярными лимфоцитарными инфильтратами, очаговой пролиферацией клеток микроглии (глиальных узелков) и дистрофией ганглиозных клеток. В срезах, приготовленных из лимфоузлов, сердечной мышцы и печени, можно обнаружить присутствие ацидофильных внутриядерных телец-

включений, несколько меньших, чем ядрышки. В лимфоузлах их находят на 6-12-й день после заражения.

ВКЧС обладает выраженным гематотропизмом в отношении костного мозга, содержащего большее количество бластных клеток, чем лимфоузлы и селезенка. Поэтому костный мозг поражается первым; ингибируются миелопоэтические и эритропоэтические клетки и пролиферируют крупные клетки с базофильной цитоплазмой. Наряду с этим обнаруживают картину глубокого цитолиза и дистрофию лимфопоэтических органов.

При подозрении на чуму для уточнения диагноза несколько тяжелобольных животных убивают и исследуют мазки из костного мозга грудной клетки.

Биопроба. Из благополучного по инфекционным болезням хозяйства берут поросят в возрасте 2-3 мес массой 20-30 кг. В качестве материала используют 10%-ную суспензию, приготовленную из органов (селезенки, лимфоузлов, костного мозга) или крови от павших животных. Суспензию обрабатывают антибиотиками, выдерживают не менее 4 ч при 4°C, центрифугируют и надосадочную жидкость используют для заражения животных. Трех поросятам вводят подкожно по 1 мл крови или по 2 мл суспензии органов. Двум животным исследуемый материал не инокулируют, содержат их отдельно для контроля. Двум поросятам, иммунным к ВКЧС, вводят исследуемый материал в тех же дозах с целью дифференциальной диагностики в отношении АЧС. За всеми животными наблюдают 21 день и ежедневно измеряют температуру тела.

Диагноз считают положительным, если 2 из 3-х неиммунных поросят заболевают, проявляя симптомы болезни, и погибают, а 2 иммунных остаются здоровыми или проявляют незначительные и кратковременные (1-4 дн) признаки болезни слабой интенсивности (повышение температуры тела не выше 41°C). Однако следует иметь в виду, что при отсутствии реакции у восприимчивых животных или в случае ее недостаточной выраженности, нельзя с уверенностью исключить присутствие вируса в исследуемом материале. Отрицательный результат заражения может быть следствием либо слишком малого количества в нем вируса, либо слабой вирулентности последнего. Поэтому следующим шагом является повторное, спустя 3-6 нед после инокуляции исследуемого материала, заражение (реинфекция) подопытных свиней на этот раз вирусом с заведомо известной вирулентностью. Отсутствие у животных реакции

на это заражение свидетельствует о приобретении ими иммунитета в результате первой инокуляции (бессимптомного переболевания) и косвенно указывает на присутствие вируса в исследуемом материале. Одновременно с проведением второй пробы заражают дополнительно двух восприимчивых поросят (контроль) вирусом, использованным для реинфекции.

Иногда биологическая проба себя не оправдывает или дает неясные результаты при выделении штаммов вируса, вызывающих легкое заболевание. Такие штаммы у инокулированных поросят вызывают хроническую болезнь. Дело осложняется тем, что штаммы со слабой вирулентностью могут не обладать иммунизирующими свойствами, а это не позволяет уточнить диагноз при использовании дополнительного контрольного заражения вирулентным штаммом (реинфекции). При диагностике заболевания, обусловленного такими штаммами могут понадобиться молодые животные и дополнительные пассажи для повышения вирулентности.

Предложена шкала оценки вирулентности полевых штаммов ВКЧС:

- слабовирулентные (патогенные лишь для поросят-сосунов) не иммунизирующие штаммы. Поросята-сосуны заболевают в первые дни жизни и смертность их велика, поросята-отъемыши (12-15 кг) реагируют только в определенные дни подъемом температуры тела, не приобретая иммунитета;

- слабовирулентные (патогенные для молодых животных) иммунизирующие штаммы. У животных массой 15-20 кг развивается хроническая болезнь, подсвинки массой 35 кг реагируют подъемом температуры тела, продолжающимся несколько дней. На вскрытии обнаруживаются незначительные точечные кровоизлияния. Животные приобретают иммунитет;

- сильно вирулентные штаммы вызывают у животных массой 30 кг острое заболевание, смертность 40% и больше. На вскрытии характерны геморрагические изменения.

Тест модуляции фагоцитарной активности макрофагов. Дефицит фагоцитарной функции приводит к нарушению локальных иммунных реакций с развитием воспалительных процессов на слизистых оболочках. При КЧС происходит локализация фагоцитарной функции лейкоцитов: при репродукции вакцинного шт. ЛК-ВНИВВиМ снижается процент и индекс фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов, а при репродукции вирулентного вируса шт. Ши-

Мышь повышается процент и индекс фагоцитоза нейтрофилов и снижается таковой у макрофагов. При КЧС *in vivo* и *in vitro* фагоцитарная активность лейкоцитов крови кратковременно (до 4 сут) снижается при инфицировании вакцинным штаммом и повышается у макрофагов при инфицировании вирулентным штаммом ВКЧС. Установленный в инфицированных клетках-мишенях цитопатический эффект, выражающийся в модуляции фагоцитарной активности свинных макрофагов, используют в диагностике КЧС.

Серологическая идентификация

Иммунофлюоресценция. Из проб органов (лимфоузлы, селезенка, почки, миндалина) готовят замороженные срезы. Из проб костного мозга и лейкоцитарного концентрата - мазки. Для приготовления последних берут грудную кость, делают продольный разрез и вынимают красный костный мозг, из которого делают несколько мазков. Для приготовления мазков из лейкоцитарного концентрата от больных или подозреваемых в заболевании свиней берут 15 мл крови с антикоагулянтом, энергично встряхивают, оставляют на 1 ч при комнатной температуре, затем отбирают плазму с лейкоцитами и центрифугируют 10 мин при 1000 мин^{-1} , из осадка лейкоцитов (беловатый осадок) делают 2-3 мазка. Приготовленные препараты (срезы и мазки) фиксируют в охлажденном ацетоне 10 мин, после испарения ацетона промывают 15-20 мин в ФБР pH 7,2 и окрашивают при 37°C 30 мин конъюгатом в рабочем разведении, к которому добавляют краситель Эванса в соотношении: 3 части конъюгата и 1 часть красителя, затем препарат промывают в фосфатном буфере и оставляют на 10 мин в дистиллированной воде. После частичного подсушивания на воздухе на препарат наносят забуференный глицерин (9 частей глицерина и 1 часть ФБР pH 8), покрывают покровным стеклом и микроскопируют. Аналогично ставят контроли: а) исследуемый материал и нормальный конъюгат с красителем Эванса; б) не инфицированный материал и специфический конъюгат с красителем Эванса.

При микроскопии фон препарата флюоресцирует красно-оранжевым цветом, ядра клеток темные, специфическое свечение характеризуется зеленым цветом цитоплазмы. В мазках из красного костного мозга и лейкоцитарного концентрата специфическая флюоресценция отличается большой яркостью и количеством флюоресцирующих клеток. Специфическое свечение в цитоплазме даже в отдельных клетках препаратов, полученных от подозре-

тельных по заболеванию животных, указывает на наличие вируса КЧС. В контрольных препаратах подобного свечения не должно быть.

Указанный метод отличается специфичностью и быстротой. Однако во избежание погрешностей метода при внедрении его в лаборатории следует иметь в виду, что специфичность результатов зависит от следующих факторов: качества сыворотки-маркера (она должна иметь высокие титры, быть моновалентной, полученной от свиней, не обработанных другими АГ), качества исследуемого материала (должен быть отобран не позже 2-3 ч после смерти животного, фиксирован в ацетоне или замораживанием и сразу же отправлен на исследование). В сопроводительном письме необходимо указывать клиническую и эпизоотологическую характеристику болезни, даты и названия прививок. При учете реакции следует иметь в виду, что вакцинный вирус сохраняется в организме вакцинированных свиней до 15 дн после вакцинации и в ИФ не дифференцируется от полевого вируса.

В Болгарии для ИФ диагностики КЧС из вены больных животных получают кровь, готовят препараты лимфоцитов и лизированных эритроцитов и вносят их в пробирки с пластинками, содержащими культуру клеток СПЭВ. Через определенные промежутки времени пластинки извлекают и подвергают ИФ-обработке для выявления АГ вируса. Первые признаки размножения вируса в клеточном монослое выявляются через 12ч после заражения. Максимального развития признаки достигают через 48-72 ч. Ценность прямого метода ИФ повышается при использовании его для прижизненной диагностики путем исследования биопсированных миндалин. В Японии с этой целью сконструирован прибор.

Установлено преимущество метода для идентификации АГ вируса с использованием культуры клеток РК-15 по сравнению с исследованием гистопрепаратов или мазков-отпечатков. В случае исследования органов свиней, иммунизированных вирус-вакцинами, когда АГ вакцинного вируса еще можно обнаружить в мазках-отпечатках, существует реальная возможность получения ложноположительных результатов. Поэтому для идентификации изолятов ВКЧС чаще применяют метод флюоресцирующих АГ в культуре клеток РК-15, который, несмотря на трудоемкость, характеризуется большей чувствительностью и легкостью учета результатов по сравнению с выявлением АГ в срезах ткани. Через 24-48 ч

после заражения обнаруживали флюоресцирующие микробляшки из 5-30 клеток.

При помощи метода ИФ в сочетании с методом культуры клеток удается диагностировать чуму почти у всех больных свиней. В таком сочетании метод позволяет обнаружить ВКЧС и в мясе вынужденно убитых животных. Для обнаружения АГ вируса в миндалинах наиболее эффективен метод непрямой ИФ с контрастированием синькой Эванса.

РНГА. Для обнаружения АГ вируса в патологическом материале из органов и тканей свиней используют следующие компоненты:

- а) АТ-эритроцитарный диагностикум;
- б) специфический АГ - вирус-вакцина КЧС;
- в) нормальный (контрольный) АГ;
- г) 1%-ный р-р нормальной лошадиной сыворотки в забуференном физиологическом р-ре с рН 7,2;
- д) формализированные и танизированные эритроциты барана;
- е) исследуемый материал.

РНГА ставят микрометодом в объеме 0,075 мл с помощью аппарата Такачи или Титертек. Готовят двукратные разведения исследуемого материала (от 1:2 до 1:512) в объеме 0,05 мл и такие же разведения контрольных АГ (специфического и нормального). Затем во все луночки вносят 0,025 мл 3%-ной суспензии эритроцитарного диагностикума. Кроме того, ставят дополнительно контроли; а) 0,05 мл 1%-ного р-ра нормальной сыворотки лошади и 0,025 мл эритроцитарного диагностикума;

б) 0,05 мл исследуемого материала в разведениях и 0,025 мл формализированных и танизированных эритроцитов. После этого пластинки встряхивают и оставляют на 1,5-2 ч при комнатной температуре. Учет реакции проводят в крестах по 4-бальной системе. РНГА считают положительной при обнаружении агглютинации не менее чем на три креста в разведениях 1:8 и выше.

РДП и ИЭОФ. Реакции различаются методами получения линий преципитации: в РДП это происходит посредством свободной диффузии р-ров АГ и АТ из лунок в агаровом геле равномерно во все стороны, а в ИЭОФ АГ и АТ движутся строго навстречу друг другу под действием электрического поля, в результате чего увеличивается их концентрация в месте встречи и там образуются более выраженные полосы преципитации.

Для постановки ИЭОФ необходим специальный прибор для электрофореза, дающий регулируемое напряжение постоянного тока до 300В. ИЭОФ в несколько раз чувствительнее метода РДП, требует незначительного количества материала и позволяет получать результаты через 30 мин. Метод стандартизован, описана методика приготовления агарозного геля. Он используется для выявления АГ ВКЧС в мезентериальных лимфоузлах и суспензии ткани поджелудочной железы при клинических случаях болезни. Помимо АГ, данный метод позволяет выявлять и специфические АТ. Метод быстрый, легко осуществим и более чувствителен для лабораторной диагностики КЧС, чем РДП.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика

В настоящее время в лабораторной диагностике КЧС используются три метода обнаружения специфических АТ к ВКЧС: реакция нейтрализации флюоресцирующих микробляшек (РНФБ), реакция непрямой ИФ и непрямой вариант твердофазного ИФА. Наиболее эффективными методами обнаружения специфических АТ к ВКЧС являются РНФБ и ИФА. Эффективность обнаружения АТ к ВКЧС в ИФА по сравнению с РНФБ составляла 96,5%. На основании этих данных непрямой вариант ИФА рекомендован для обнаружения специфических АТ к ВКЧС.

НИФ. НИФ применяется для выявления и титрования АТ в сыворотках крови переболевших свиней. Используют зараженные вирусом перевиваемые клетки (РК-15) на стеклышках, на которых титруют испытуемые сыворотки в 2-кратных разведениях от 1:20 до 1:640 в непрямой ИФ по общепринятой методике с использованием во втором этапе реакции антисвиного ФИТЦ-Ig. Титром АТ к КЧС считают последнее разведение сыворотки, обеспечивающее зеленое свечение (на 2 креста) диффузного цитоплазматического АГ вируса при отсутствии подобного свечения в контролях с интактными тест-объектами и нормальной свиной сывороткой.

Реакция нейтрализации флюоресцирующих бляшек (РНФБ). В качестве чувствительной системы необходимо использовать перевиваемую культуру клеток РК-15, выращенную на покровных стеклах в пробирках. РНФБ проводят микрометодом, используя пластиковые панели Titertek. Суспензию клеток (в 1 мл 10-800 тыс. клеток) готовят на среде Игла (МЕМ) с 5% фетальной сыворотки крови КРС с добавлением буфера HEPES. Постановка микрометодом РНФБ более производительна, чем использование

макрометода. Данный метод может успешно применяться и для титрования специфических АТ. Пробы сывороток крови берут от животных не ранее 15 дн после клинического выздоровления. Перед использованием их инактивируют при 56°С 30 мин. Сыворотки разводят от 1:2 до 1:2560 и смешивают с равным объемом вакцинного вируса в количестве 100 ККИД₅₀ (клеточнокультуральных инфекционных доз), встряхивают и выдерживают 60 мин при 37°С. Каждое разведение сыворотки с вирусом вносят по 0,4 мл в 4 пробирки с культурой клеток РК-15 на стеклышках. Адсорбируют 2 ч при 37°С. Смесь сыворотка-вирус сливают, отмывают клетки средой, заливают 2 мл поддерживающей среды и инкубируют при 37°С. Реакцию учитывают через 48 ч инкубации. Препараты вынимают из пробирок, ополаскивают в 0,01 М ФБР рН 7,2-7,4 и обрабатывают, как указано выше (см. "Выделение вируса в культуре клеток"). Реакция сопровождается соответствующими контролями (смесь вируса со средой, гипериммунной и нормальной сыворотками и незараженная культура клеток). Отсутствие флюоресцирующих микробляшек (при наличии их в контроле вируса в смеси с питательной средой и нормальной сывороткой) в препаратах ВКЧС, обработанных гипериммунной и испытуемыми сыворотками в разведении 1:2 и выше, указывает на наличие в материалах специфических АТ. Титром АТ считают то предельное разведение сыворотки, при котором наблюдается полное подавление образования флюоресцирующих микробляшек.

Во избежание получения ложных результатов при использовании культуры клеток необходимо добавлять в среду бычью сыворотку, свободную от вируса диареи КРС и АТ. ВНА выявляются через 21 день после заражения. Обнаружение их с помощью непрямой ИФ в культуре клеток широко применяли в США на последних этапах программы искоренения болезни. Однако при интерпретации результатов следует учитывать частые случаи инapparантной инфекции у свиней, вызванной серологически родственным вирусом диареи КРС, поэтому все положительно реагирующие сыворотки свиней необходимо исследовать и на вирус диареи.

Для массового обследования свиней на субклиническую инфекцию КЧС в ФРГ предложен тест, сочетающий РН с ИФ. В качестве тест-системы используют культуру клеток РК-15. Если у одной или нескольких свиноматок отдельного стада в сыворотке кро-

ви обнаруживают ВНА, всех поросят убивают с последующим исследованием органов ИФ.

При исследовании проб сывороток из неблагополучных хозяйств в РН (с 200-300 БОЕ патогенного шт. Альфорт 331) до 50% их оказалось положительными. Наличие АТ свидетельствовало о носительстве вируса. Вирус смогли выделить только у молодых поросят.

Описана усовершенствованная методика выявления ВНА к ВКЧС, в которой постановка теста значительно облегчена за счет использования цитолитического штамма вируса, выделенного из персистентно инфицированной перевиваемой культуры клеток JB-RS-2 и индуцировавшего четкое ЦПД в нескольких перевиваемых линиях клеток почки поросенка. Реакцию ставят в культуре клеток РК-15 на микропанелях при 38°C в термостатах с подачей CO₂. По воспроизводимости и чувствительности методика не уступает реакции с использованием метода ИФ АТ, но требует значительно меньшего труда. Предлагаемый метод обладает рядом преимуществ: исключает необходимость использования ИФ; учет результатов можно проводить без микроскопа; реакцию ставят микрометодом; используемый вирус аттенуирован. Для постановки РН необходимо вначале провести титрование ВКЧС.

Титрование ВКЧС. Поскольку титрование на чувствительных подсвинках связано с экономическими трудностями, а в культуре клеток вирус не вызывает ЦПД, то для титрования используют разработанный Менлингом в 1963 г. метод ИФ зараженных серийными разведениями вирусосодержащего материала культур клеток. Точное определение инфекционной активности вируса может быть осуществлено методом флюоресцирующих бляшек. Для этого с монослоя клеток удаляют ростовую среду и заражают каждым разведением вируса (от 10⁻¹ до 10⁻⁶) по 0,4 мл в 6 пробирок культуры клеток РК-15, выращенных на пластинках. После 2 ч инкубации в пробирки добавляют по 2 мл поддерживающей среды и инкубируют 72 ч при 37°C. Затем по 4 пластинки на каждое разведение вируса вынимают из пробирок и обрабатывают методом прямой ИФ, как указано выше (см. "Выделение вируса в культуре клеток").

Титром ВКЧС считают наибольшее его разведение, вызывающее образование специфического цитоплазматического АГ, выявляемого после второго пассажа вируса в культуре клеток РК-15.

Титр вычисляют по методу Рида и Менча, выражая его в ККИД₅₀/объем. При рассмотрении такого монослоя в люминесцентном микроскопе обычно обнаруживают флюоресцирующие фокусы, состоящие из 20-30 инфицированных клеток. Число таких фокусов обычно соответствует числу инфекционных единиц в инокуляте. Такой метод имеет преимущества, так как инфекционные титры воспроизводимы и могут быть определены уже через 24 ч после инфицирования культуры; титр вируса обычно бывает высоким, точность метода удовлетворительная и результаты можно получить уже через 24 ч. Однако метод довольно сложен, чтение результатов под микроскопом при массовых исследованиях утомительно. Метод обладает тем важным преимуществом, что позволяет идентифицировать и титровать даже ослабленный, применяемый в качестве живой вакцины вирус. Установлена некоторая разница между титрами вируса по ЦПД, ИФ и титром патогенным для свиней.

ИЭОФ. Используется в 1%-ной агарозе как диагностический при выявлении АТ к ВКЧС в сыворотках зараженных свиней. Для исследования применяется АГ, экстрагированный из зараженных ВКЧС клеток РК-15. Показано, что этот культуральный АГ ВКЧС идентичен преципитирующему АГ вируса, экстрагированного из ткани селезенки зараженных свиней. Обнаружено, что ПА к ВКЧС появляются в сыворотках через 2-3 нед после заражения животных слабовирулентными штаммами или модифицированным живым вакцинным штаммом. Выявлено, что метод ИЭОФ в 2-16 раз чувствительнее, чем иммунодиффузия в агаровом геле. Несмотря на меньшую его чувствительность по сравнению с РН, результаты, полученные с помощью ИЭОФ, хорошо согласуются с результатами, полученными методом подавления бляшкообразования. Считается, что ПА к ВКЧС могут персистировать до 3 лет после 1-кратной вакцинации шт. С. Методом ИЭОФ невозможно было дифференцировать АТ к ВКЧС от АТ к вирусу диареи КРС; при получении положительных результатов необходимо сочетать его с РН.

ИФА в непрямой модификации. На миллипоровские фильтры (тип ОН, диаметр пор 0,3 мкм), диаметр которых равен 0,6 см, смоченные р-ром АГ ВКЧС, наносят свиные сыворотки. Затем фильтры инкубируют в р-ре кроличьего IgG (против IgG свиньи), меченого пероксидазой хрена RZ=3,0. Активность связанной пероксидазы определяют в р-ре субстрата 3,3-диаминобензидина.

Опытные образцы окрашивались в коричневый цвет, контрольные оставались бесцветными. Реакция громоздкая.

ELISA. Разработан метод определения АТ к ВКЧС на микроплатах, поддающийся автоматическому анализу. Описана методика получения очищенного и концентрированного АГ для теста ELISA из шт. Альфорт, размноженного в культуре клеток РК-15. Результаты ELISA и РН близки. ELISA легок в выполнении, дешев, позволяет быстро исследовать большое количество образцов, высокочувствителен и рекомендован в качестве метода оценки при крупномасштабных обследованиях.

С использованием иммуноглобулинов баранов, инфицированных ВКЧС, разработана технология изготовления ИФ-конъюгатов, пригодных для выявления вирусного АГ в патологическом материале. При постмортальной диагностике вирус выявляется со 100% эффективностью без биологического накопления. При экспериментальном заражении вирус в пробах мочи и крови обнаруживали через 8-10 ч, при контактном заражении - через 72-96 ч. Положительные результаты при индикации ВКЧС в объектах ветеринарного надзора (зерно, почва, вода) получены при концентрации вируса, превышающей 100 ИД₅₀/мл (мг) (100). Показано успешное применение ИФА для выявления ВКЧС в культуре клеток РК-15.

Описано получение монАТ для диагностики КЧС на мышах линии BALB/c 4-кратно иммунизированных ВКЧС (шт. Альфорт). Клетки селезенки мышей "сливали" с миеломными клетками Sp2/0. Полученные гибридомы культивировали в 20% среде ДМЕМ Ну-Нт при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Продуцирующую специфические АТ культуру дважды субклонировали и после определения изотипа АТ инокулировали интраперитонеально мышам BALB/c. Образующаяся асцитная жидкость содержала высокие концентрации монАТ, которые после соответствующей очистки конъюгировали пероксидазой хрена.

Разработан способ изготовления иммуноферментных конъюгатов для ИФА с использованием монАТ к ВКЧС с сохранением активности фермента и высокой специфической активностью иммуноглобулина, а также метод флюоресцирующих зондов (МФЗ), который не уступал по чувствительности и специфичности МФА. Разработан метод выявления ВКЧС методом молекулярной гибридизации и ПЦР.

Дифференциальная диагностика. КЧС необходимо отличать от африканской чумы, пастереллеза, сальмонеллеза, рожи, БА, ВД-БС, парагриппа и гриппа. При африканской чуме ярче выражен геморрагический диатез, увеличена и размягчена селезенка, полнокровие и кровоизлияния в почках. Чаще поражаются, имея вид кровяных сгустков, портальные, почечные и брыжеечные лимфоузлы. Сильно выражен отек интерстициальной ткани легких, скопление в грудной полости кровянистой жидкости. Редко отмечают инфаркт селезенки, постоянно - тотальный распад лимфоцитов и тканей лимфоидных органов. Для дифференциации ставят тест перекрестного иммунитета, тест гемадсорбции и РИФ.

Пастереллез, как правило, не принимает характера эпизоотии, поражает преимущественно взрослых животных. Для него характерны отек подкожной клетчатки подчелюстного пространства, распространяющийся на шею и глотку, серозный лимфаденит, фибринознонекротизирующая пневмония, слабо выраженный геморрагический диатез. Кроме того, обнаруживают возбудителя при бактериологическом и биологическом исследованиях.

Рожа обычно возникает в летний период года и характеризуется застойными явлениями кожи (рожистая эритема) и во внутренних органах, увеличением селезенки, гломерулонефритом и катаральным гастроэнтеритом. Рожу свиней диагностируют выделением возбудителя. Не исключено одновременное течение чумы и рожи. В этом случае диагноз ставят на основании биологической пробы на чуму и бактериологического исследования на рожу.

Сальмонеллез наблюдают спорадически и энзоотически среди молодняка 1-5-мес возраста. Характеризуется слабым геморрагическим диатезом, развитием в толстом кишечнике плоских рыхлых струпьев и язв, а не "бутонов", очаговыми некрозами печени. Результаты бактериологических исследований являются также основанием для дифференциации КЧС.

Грипп и парагрипп свиней исключаются вирусологическим исследованием материала, взятого из верхних дыхательных путей (наличие ГА вирусосодержащего материала в первых пассажах на КЭ, гемадсорбции в культуре ткани, цитоплазматических включений при риноцитоскопии).

Болезнь Ауески чаще наблюдается среди поросят. Проводят вирусологические исследования и биопробу на кроликах.

Вирусную диарею у инфицированных свиней устанавливают с помощью ПЦР, поскольку большой неструктурный протеин пести-вирусов 125 кД высоко консервативен, а мажорный протеин кон-верта gm.53 четко различается у ВКЧС и диареи КРС.

Контрольные вопросы. 1. Правила взятия, оформления и от-правки в лабораторию патматериала для исследования? 2. Как ста-вят диагноз на КЧС? 3. Дифференциальная диагностика КЧС. 4. Методы лабораторной диагностики КЧС. 5. На чем основана лабо-раторная диагностика на КЧС?

Использованная литература

1. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Ветеринарная вирусология. – Изд.2-е. – М.: Агропромиздат, 1991.
2. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: Агропромиздат, 1991.
3. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 1998.
4. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. – М.: Агропромиздат, 1998.
5. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А.. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос, 1999.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Зеркалев Д.Ю.
Учебное пособие «Диагностика классической чумы свиней».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13