

УДК 619:616-07:619:616.98:578.831.31:636.4
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-30-34>

Красникова Е.Л., научный сотрудник
Садовский А.Л., ветеринарный врач-консультант

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР РЕАЛ-ТАЙМ В МОНИТОРИНГЕ ПАТОЛОГИИ СВИНЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ЦИРКОВИРУСОМ ВТОРОГО ТИПА

Резюме

В статье приведены данные по персистенции цирковируса второго типа в одном из хозяйств Республики Беларусь. Установлено наличие генома возбудителя у свиней разного возраста, приведены сравнительные данные результатов ПЦР- и ИФА-исследований.

Ключевые слова: комплекс респираторных заболеваний свиней, диагностика, свиньи, респираторные инфекции, полимеразная цепная реакция, вирусные инфекции, цирковирус второго типа, геном, ДНК, РНК, иммуноферментный анализ.

Summary

The article presents data on the persistence of type 2 circovirus in one of the farms of the Republic of Belarus. The presence of the pathogen genome in pigs of different ages was established, and comparative data on the results of PCR and ELISA were presented.

Keywords: complex of respiratory diseases of pigs, diagnostics, pigs, respiratory infections, polymerase chain reaction, viral infections, circovirus of the second type, genome, DNA, RNA, enzyme immunoassay.

Поступила в редакцию 28.06.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Цирковиральная инфекция свиней – мультисистемное заболевание, возбудителем которого является цирковирус свиней.

Цирковирусы входят в состав рода *Circovirus* семейства *Circoviridae* – это представители семейства мелких (17 нм) безоболочечных вирусов икосаэдральной формы, содержащих кольцевую одноцепочечную ДНК. Представители семейства были впервые обнаружены в прошлом столетии. Семейство *Circoviridae* включает три рода: *Circovirus*, *Gyrovirus* и *Anellovirus* [1, 2].

Цирковиральные инфекции свиней распространены в странах с развитым свиноводством. В то время как ЦВС-1 не патогенен для рассматриваемого вида животных, ЦВС-2 является первичным этиологическим агентом синдрома мультисистемного истощения поросят-отъемышей (СМИО), ассоциирован с синдромом нефропатии и дерматитов поросят (СНДП), вовлечен в респираторную и репродуктивную патоло-

гию свиней. Кроме того, может вызывать клинические симптомы заболеваний пищеварительной, лимфатической, кровеносной и нервной систем, а также изменений на коже [3].

Доказано, что источником возбудителя инфекции являются больные и латентно инфицированные свиньи различных возрастных групп, у которых вирус выделяется с фекалиями, слюной и слезной жидкостью, а также присутствует в сыворотке крови инфицированных животных [2].

ЦВС-2 может вызывать у свиней персистирующую инфекцию. ДНК ЦВС-2 обнаруживали в тканях свиней, подвергшихся убою на 125 день после заражения [4, 5]. Свиньи, хронически инфицированные ЦВС-2, встречались как в благополучных, так и в неблагополучных по СПМИ хозяйствах [6]. Совместное использование современных методов ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ИФА (иммуноферментный анализ) диагностики позволяет своевременно выявлять цирковирус и антитела

к нему, а следовательно, корректировать методы и схемы профилактики данного заболевания.

Цель работы – определить персистенцию цирковируса второго типа у свиней с респираторной патологией методом ПЦР реал-тайм. Сравнить результаты ПЦР и ИФА сывороток крови животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали сыворотки крови от свиней разного возраста и физиологического состояния, а также патологический материал и сперму из хозяйства закрытого типа, полного цикла. Завоз поголовья со стороны не проводился. Хозяйство благополучно по цирковирусу второго типа, соответственно, вакцинация не проводилась.

Ранее проведенные клинические исследования животных указывают на наличие респираторной и репродуктивной патологии. Отдельные клинические признаки (пневмонии, нефропатия) свидетельствуют о возможной циркуляции цирковируса второго типа.

Выделение ДНК проводили набором ДНК/РНК-фактор (фирмы «Ветфактор», Россия), согласно прилагаемой к набору инструкции.

Для постановки ПЦР использовали набор «PCV-2 PCR REAL TIME», сконструированный в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Выше-

лесского» согласно прилагаемой инструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анамнестические данные 2020–2021 гг. указывают на единичные случаи возникновения клинической картины, схожей с цирковирусной инфекцией.

В декабре 2021 г. были проведены исследования сывороток крови в ИФА набором фирмы Ingenasa (Испания) и получены положительные результаты, указывающие на наличие в сыворотках антител к цирковирусу второго типа. Эти же сыворотки были объединены и привезены в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», где проведены ПЦР-исследования и получены следующие результаты (рисунок 1).

Установлено, что 3 пробы сыворотки были отрицательными, 1 проба сомнительная, остальные положительные. Исходя из проведенных ранее исследований нами установлено, что при Ct 25–27 в ПЦР количество геном-эквивалента указывает на то, что в пробах достаточно вируса для развития инфекционного процесса, а при Ct 30 и выше наиболее часто можно говорить о носительстве вируса без видимой клинической патологии. Так, у поросят в возрасте до 25 дней и в 70–80 дней количество генома вируса незначительно, тогда как количества антител достаточно для формирования иммунитета.

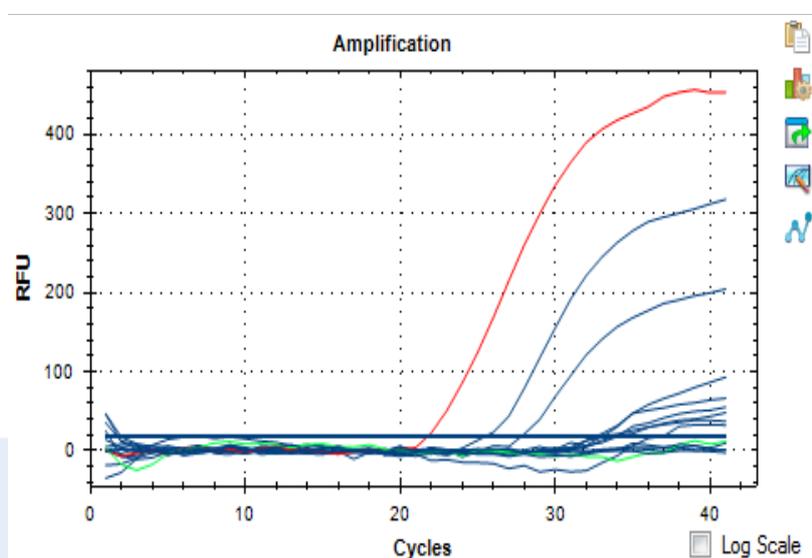


Рисунок 1. – Результаты ПЦР-реал-тайм ДНК, выделенной из сывороток крови свиней с праймерами к цирковирусу второго типа

ИФА-набор фирмы Ingenasa, согласно инструкции, позволяет интерпретировать данные и диагностировать стадию

развития инфекционного процесса с отличием вакцинных титров антител от инфекционных (таблица 1).

Таблица 1. – Результаты ИФА- и ПЦР-сывороток крови свиней разного возраста

Животные и возраст	Интерпретация результатов ИФА	Соотношение Ig G/IgM	Результаты ПЦР, Ct
Поросята 25 дней	колостральные антитела	1,1/0,2	32,81
Поросята 50 дней	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	0,46/0,28	30,55
Свиньи 70–80 дней	нет инфекции	0,22/0,34	32,15
Свиньи 100 дней	острое инфицирование у 30 % исследуемых	0,5/0,88	23,32
Свиньи 130 дней	хроническая инфекция у 30 % недавно инфицированных	1,82/0,84	25
Свиньи 170 дней	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,85/0,49	28,42
Ремонтные свинки перед осеменением	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,86/0,54	28,49
Ремонтные свинки 80 дней супоросности	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,48/0,48	28,22
Свиньи 1–2 опороса	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,3/0,36	24,89
Свиньи 3–4 опороса	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,37/0,4	28,73
Свиньи 5–6 опороса	50/50 – хроническое инфицирование и чистые животные, присутствует 1 проба от недавно инфицированного животного	0,9/0,53	34,38

Примечание – получение полной корреляции невозможно, т.к. для ПЦР-исследования использовались объединенные пробы, в каждой пробе объединялись по 6 сывороток крови

В хозяйстве вакцинация против цирковируса второго типа не проводилась, так как оно считалось благополучным, поэтому можно с полной уверенностью утверждать, что в сыворотках крови хронически инфицированных животных с характерной клинической картиной присутствует достаточное количество вирусного генома, равное 10^5 – 10^6 геном-эквивалента, что, по данным исследователей [6], достаточно для наличия характерной клинической картины. В сыворотках крови групп хронически инфицированных животных, в которых до 30 % животных с острым инфицированием, количество геном-эквивалента 10^6 – 10^7 в мл.

При хроническом инфицировании Ct

составляло 32–34, что соответствовало 10^3 – 10^4 геном-эквивалента/мл.

У свиней в возрасте 70–80 дней антитела отсутствовали, но при постановке ПЦР установлено наличие генома вируса в количестве 10^2 – 10^3 , что говорит о наличии вируса в организме животных в следствие недавнего инфицирования. Эти данные не противоречат исследованиям более ранних источников, в которых указано, что при заражении антитела могут быть обнаружены через 11–90 дней после заражения [7].

Параллельное использование ИФА и ПЦР позволяет в случаях со спорными результатами (например, у свиней в возрасте 170 дней количество и соотношение

иммуноглобулинов указывает на хроническое инфицирование или поствакцинальные антитела, а проведенные ПЦР-исследования указывают на наличие генома в количестве, способном вызывать заболевание, также картина патологоанатомических изменений указывает на пневмонии и нефриты) установить наличие возбудителя и статус инфекции.

Дополнительно были проведены исследования патологического материала от поросят в возрасте 25, 50, 70 и 90 дней.

На вскрытии у таких поросят наблюдались:

- точечные кровоизлияния в почках,

граница коркового и мозгового вещества стерты;

- поражения легких, участки катаральной и геморрагической пневмонии;
- увеличение или уменьшение селезенки;
- кровоизлияния в брыжеечных лимфоузлах;
- дистрофические изменения в печени.

Согласно проведенным ПЦР-исследованиям все пробы были положительными, количество геном-эквивалента цирковируса второго типа незначительно зависело от возраста (рисунок 2).

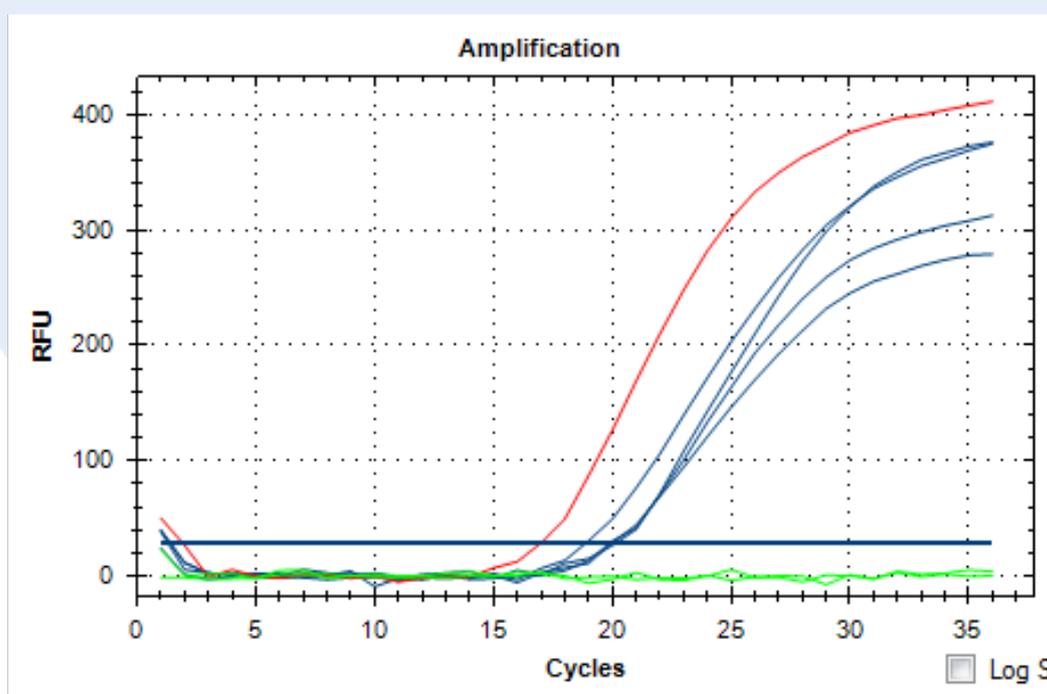


Рисунок 2. – Результаты ПЦР-реал-тайм ДНК, выделенной из патологического материала от свиней разного возраста, с праймерами к цирковирусу второго типа

Во всех возрастных группах поросят, павших с признаками респираторной патологии St составило 18–20, что соответствует геном-эквиваленту 10^7 – 10^8 в мл. Так как при жизни у поросят наблюдалась картина респираторной патологии, а при вскрытии присутствовали признаки мультисистемного поражения, можно сказать, что такого количества вирусного генома достаточно для развития заболевания.

Одним из факторов риска, по литературным источникам, может стать привозная сперма [6]. Нами были проведены ис-

следования четырех спермодоз на наличие возбудителя цирковируса. По результатам проведенных исследований установлено, что в сперме отдельных хряков выявлялся геном цирковируса второго типа, причем количество соответствовало 10^5 геном-эквивалента/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В хозяйстве, где проводились наши исследования, геном цирковируса второго типа обнаруживается не только в сыворотках крови свиней, но и в патологическом

материале в количестве 10^5 – 10^8 геном-эквивалента/мл, способном вызвать заболевание у животных.

Используемая в хозяйстве сперма содержит геном цирковируса второго типа, что может быть источником инфицирования.

В зависимости от стадии заболевания данные ПЦР и ИФА коррелируют друг с другом, при первичном недавнем инфицировании животных результаты ПЦР положительные при отсутствии антител в сыворотках крови.

Набор ПЦР реал-тайм, разработанный в РУП «Институт экспериментальной

ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», позволяет выявлять геном цирковируса второго типа из сывороток крови свиней разного возраста. Исследования сывороток крови методом ПЦР позволяют контролировать ситуацию в стаде и своевременно выявлять животных, недавно инфицированных цирковирусом второго типа.

Одновременное использование в диагностике цирковируса второго типа ПЦР и ИФА позволяет сделать своевременные выводы о благополучии хозяйства по данному заболеванию, а следовательно, скорректировать методы и схемы профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красникова, Е. Л. Комплекс респираторных патологий свиней в хозяйствах Беларуси / Е. Л. Красникова, А. С. Андрусевич, О. В. Мальчик // Экология и животный мир. – 2020. – № 2. – С. 37–41.
2. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication / G. M. Allan [et al.] // Arch. Virol. – 2000. – Vol. 145. – № 11. – P. 2421–2429.
3. Гречухин, А. Н. Особенности проявления цирковирусной инфекции свиней и ее специфическая профилактика / А. Н. Гречухин // Свиноводство. – 2010. – № 2. – С. 48–50.
4. Krakowka, S. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of PCV-2-associated postweaning multisystemic wasting disease (PMWS) / S. Krakowka, J. Ellis, F. McNeilly // Vet. Pathol. – 2004. – № 41. – P. 471–481.
5. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus / S. Krakowka [et al.] // Vet. Pathol. – 2000. – Vol. 37. – № 3. – P. 254–263.
6. Hamel, A. L. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus / A. L. Hamel, L. L. Lin, C. Sachvie // Can. J. Vet. Res. – 2000. – V. 64. – P. 44–52.
7. PCR detection and proof of isolation of porcine circovirus type 2 in boar semen / R. Larochelle // J Clin Microbiol. – 2000; 38. – P. 4629–4632.



**ПРЕПАРАТ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ**

КМП ПЛЮС



- содержит железо, йод, селен, цинк, марганец, кобальт;
- профилактика заболеваний крупного рогатого скота и свиней, обусловленных дефицитом входящих в его состав биоэлементов;
- лечение телят, больных энзоотическим зобом, железодефицитной анемией, беломышечной болезнью, токсической дистрофией печени;
- улучшение воспроизводительной функции коров и свиноматок, профилактика у них родовой и послеродовой патологии;
- повышение жизнеспособности новорожденного молодняка

