

УДК 619:616.98:578:636.4

Красникова Е.Л., старший научный сотрудник¹
 Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Садовский А.Л., ветеринарный врач-консультант
 Громов И.Н., доктор ветеринарных наук, профессор²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

²Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК ЦИРКОВИРУСА ВТОРОГО ТИПА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ СВИНЕЙ

Резюме

В статье приводятся данные патологоанатомической картины внутренних органов свиней разного возраста, а также результаты исследования различных биологических жидкостей с целью использования их в диагностике цирковиральной инфекции свиней.

Установлено, что наиболее доступными и информативными биологическими жидкостями являются носовая слизь и сперма. Из фекалий также выделяется геном цирковирала второго типа.

Исследование патологического материала указывает на то, что наибольшее количество геном-эквивалента выделяется от свиней в возрасте 90 дней.

Ключевые слова: ПЦР-диагностика ЦВС, ЦВИ, цирковирала свиней, PRDC.

Summary

The article presents data on the pathoanatomical picture of the internal organs of pigs of different ages, and studies various biological fluids from pigs of different ages with the aim of using them in the diagnosis of pig circovirus infection. It has been established that the most accessible and informative biological fluid is nasal mucus and sperm. The genome of circovirus type 2 is also isolated from feces.

Isolation of the circovirus genome from pathological material indicates that the largest amount of the genome equivalent is isolated from pigs at the age of 90 days.

Keywords: PCR diagnostics of PCV, porcine circovirus, PRDC.

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Цирковирала второго типа (ЦВС-2, PCV2) является первичным патогеном, вызывающим ряд патологий в свиноводстве, характеризующийся разнообразием синдромов, включая синдром мультисистемного послеотъемного истощения, синдром дерматита и нефропатии, респираторный и ряд других. Цирковирала свиней второго типа относится к семейству *Circoviridae* и роду *Circovirus*.

Цирковирусы – это мелкие просторганизованные одноцепочечные вирусы, имеющие сегментированный кольцевой геном.

ЦВС-2 является первичным возбудителем нескольких синдромов, известных под общим названием «болезни, связанные с цирковиралом свиней» (PCVAD, ЦВЗС) [1, 2, 4]. Синдромы, связанные с PCVAD,

являются результатом коинфекции вируса PCV2 и других патогенов, таких как микоплазма и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней [2, 3, 5].

Инфекция ЦВС-2 присутствует во всех крупных странах с производством свиней, и число выявленных случаев ЦВС быстро растет. В США максимальные потери составляют до 20 долларов на свинью [2, 3, 5].

На сегодняшний день выделяют ЦВС1, ЦВС2 и ЦВС3. Другими известными вирусами этого рода являются цирковирала канареек, цирковирала гусей, цирковирала голубей и т.п. Род *Gyrovirus* отличается тем, что имеет негативный смысловой геном и более крупные вирионы. Цирковирусы специфичны для хозяев, большинство из них являются птичьими или имеют относительно узкий круг хозяев. Некото-

рые виды вызывают истощение лимфоидных органов у инфицированных хозяев, тогда как другие – субклиническую инфекцию [2, 3, 5].

PCV1 и PCV2 имеют небольшой безоболочечный икосаэдрический вирион с однополовым кольцевым геномом ДНК, соответственно, они содержат 2 основные открытые рамки считывания (ORF-ORF1 кодирует белки репродукции вируса (Rep), а ORF2 кодирует белок капсида (Cap), который содержит иммунодоминантные антигенные эпитопы ORF1. PCV1 и PCV2 имеют 83%-ную идентичность нуклеотидов и 86%-ную – аминокислот [1, 3, 4].

Цирковирус второго типа наиболее опасен для свиней, т.к. вызывает в стаде цирковиральную инфекцию (ЦВИ), характеризующуюся мультисистемным поражением свиней разного возраста [1, 4]. Согласно проведенным нами ранее исследованиям, заболевание регистрируется в хозяйствах на территории Республики Беларусь [1].

Цель исследования – определить корреляцию выделения ДНК цирковируса свиней второго типа из биологического и патологического материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб производился в хозяйстве, где вакцинация против цирковируса второго типа не проводится. Исследовали биологический материал (сыворотка крови свиней разного возраста, патологический материал от поросят (легкие, почки), аборт-плоды, сперма, носовая слизь). Исследования проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР), учитывались наличие клинической картины у животных, а также патологоанатомические изменения. Группы животных в исследовании:

- свиноматки (от них параллельно отбирали носовую слизь и кровь);
- хряки (параллельно отбирали кровь, сперму, тестикулярную жидкость);
- ремонтные свинки (отбирали кровь);
- свиньи возраста 45, 60, 95, 130–180 дней (прижизненно отбирали носовую слизь, а также патологический материал – кусочки паренхиматозных органов).

Пробоподготовка:

- патологический материал отбирали свежим, на границе здоровой и пораженной ткани. Смесь тканей почек, печени, селе-

зенки и легких измельчали в ступке до гомогенной массы с физраствором, затем центрифугировали при 13000 об/мин. В исследование брали надосадочную жидкость;

- у абортированного плода отбирали участок пуповины, внутригрудную и брюшную жидкости, а также кусочки почек и легких, пробоподготовку проводили аналогично патологическому материалу;

- носовая слизь отбиралась ватными палочками, транспортировалась без транспортной среды в чистых сухих стерильных пробирках, затем центрифугировалась в течение 5 мин при 12000 об/мин;

- сыворотку крови, сперму, тестикулярную жидкость использовали без предварительной подготовки;

- фекалии отбирали из анального прохода с помощью зонда и помещали в чистые стерильные пробирки.

Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из материала выделяли набором ДНК/РНК фактор («Ветфактор», Россия) согласно инструкции.

ПЦР проводили на амплификаторе «С 1000 Thermal Cycler» с блоком CFX96 Real Time System, BIO-RAD (США). Для ПЦР использовали набор реагентов для обнаружения возбудителя цирковируса второго типа у свиней методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «PCV-2 PCR REAL-TIME» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» согласно инструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований нами установлено, что у молодняка наблюдаются признаки респираторной патологии и ММА (метрит-мастит-агалактия) у взрослых животных, а также встречаются аборты, прохолосты у свиноматок.

При патологоанатомическом вскрытии трупа мертворожденного поросенка нами обнаружены кровоизлияния на почках, спавшиеся легкие, небольшое количество транссудата в грудной и брюшной полостях, отек миокарда. Селезенка и печень без изменений (таблица 3).

При осмотре патологического материала от поросят разных возрастных групп нами установлены мелкие точечные крово-

излияния в корковом веществе почек, признаки катаральной и геморрагической пневмонии, поражение каудальных и верхушечных долей легких, в группах 95 и 130 дней

междольковые пространства отечны, увеличена селезенка, у отдельных животных – инфаркты селезенки, жировая дистрофия печени (таблицы 1, 2).

Таблица 1. – Патологоанатомические изменения в легких свиней

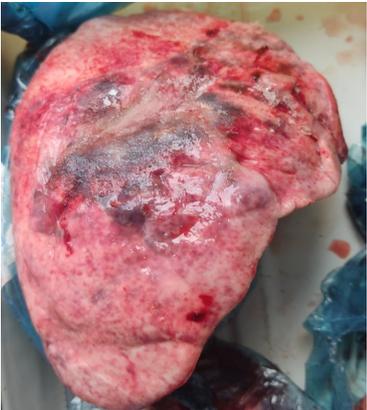
	Описание	Процесс
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. Консистенция тестоватая, цвет серо-розовый, рисунок дольчатого строения нечеткий. Кусочки легких плавают тяжело, полностью погружившись в воду. На поверхности под капсулой имеются множественные очажки размером 3-4 мм темно-красного цвета, четко отграниченные от паренхимы. Кроме того, выявляются обширные подкапсулярные кровоподтеки темно-красного цвета</p>	<p>Выраженный отек легких, кровоизлияния и гематомы в паренхиме. Может быть при вирусных инфекциях (признак сильного кашля)</p>
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. Консистенция передних долей плотная, цвет темно-красный, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки легких тонут в воде. В диафрагмальных долях имеются множественные инкапсулированные очаги размером 1-1,5 см, заполненные серо-желтым сметанообразным содержимым</p>	<p>Гнойно-катаральная, абсцедирующая пневмония</p>
	<p>Каудальные доли легких не спавшиеся, форма не изменена. Цвет темно-красный, консистенция плотная, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки долей легких тонут в воде</p>	<p>Фрагмент диафрагмальной доли легких с признаками катарального воспаления. Может быть признаком многих бактериальных болезней</p>
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. В передних и частично в диафрагмальных долях имеются пораженные дольки темно-красного цвета плотной консистенции. Рисунок долек в них усилен, кусочки тонут в воде. В каудальных долях имеются признаки отека и точечные кровоизлияния</p>	<p>Острая лобулярная катаральная пневмония с локализацией в передних и каудальных долях легких. Отек и точечные кровоизлияния в легких</p>

Таблица 2. – Патологоанатомические изменения в почках и печени свиней

	Описание	Процесс
	<p>Почка увеличена в размере, капсула напряжена, консистенция мягкая, цвет светло-коричневый. Под капсулой имеются множественные уплощенные очажки темно-красного цвета, четко отграниченные от окружающих тканей. Селезенка не увеличена в размере. По ее краям выявляются множественные очаги черно-красного цвета, четко отграниченные, возвышаются над поверхностью органа. На разрезе их периферическая часть темно-красного цвета, центральная – серо-желтого</p>	<p>Смешанные инфаркты в селезенке, зернистая дистрофия почек с точечными подкапсулярными кровоизлияниями</p>
	<p>Селезенка увеличена в размере, края притуплены. Консистенция мягкая. На разрезе цвет темно-красный, рисунок лимфоидных узелков и трабекул стерт, соскоб пульпы тыльной стороной ножа обильный</p>	<p>Септическая селезенка (геморрагический спленит)</p>
		<p>Зернистая дистрофия почки, острая катаральная пневмония, отек легких, смешанные инфаркты в легких</p>

Таблица 3. – Патологоанатомические изменения внутренних органов мертворожденных поросят

	Описание	Процесс
	<p>Легкие спавшиеся, светло-красного цвета, упругой консистенции, рисунок долек нечеткий, кусочки тонут в воде. Отдельные дольки с кровоизлияниями, темно-красного цвета. Миокард красно-коричневого цвета, отечный, рисунок волокнистого строения не заметен</p>	<p>Тотальный ателектаз легких, кровоизлияния. Отек миокарда</p>
		<p>Отек легких</p>
	<p>Легкие спавшиеся, серо-розового цвета, уплотнены, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки легких тонут в воде</p>	<p>Ателектаз, интерстициальная пневмония (начальные стадии)</p>

При постановке ПЦР с ДНК, выделенной из патологического материала с вышеописанной клинической картиной, нами были получены следующие результаты (таблица 4).

Таблица 4. – Сравнительные результаты ПЦР ДНК из патологического материала от свиней с картиной характерной PCVAD

№ п/п	Наименование материала и возраст животных	Результаты	C(t) (пороговый цикл)
1	20 дней	положительно	25,28
2	30 дней	положительно	22,68
3	21-45 дней	положительно	23,17
4	50 дней	положительно	24,09
5	65 дней	положительно	23,46
6	70 дней	положительно	22,69
7	75 дней	положительно	22,80
8	90 дней	положительно	20,64
9	137 дней	положительно	22,83
10	мертворожденный	положительно	21,87
11	семенная жидкость	положительно	22,50
К+			20,56
К-			-

Согласно проведенным ранее исследованиям большинство показателей Ct соответствует 10^{6-7} копий/мл геном-эквивалента, что свидетельствует о наличии инфекционного процесса в организме животного и подтверждает клиническую и патологоанатомическую картину у исследуемых свиней.

Для оценки биологического материала, пригодного для ПЦР диагностики ЦВС-2, нами от двух групп животных отобрана носовая слизь, фекалии и кровь (для работы использовали сыворотку). В каждой группе выделили по 5 животных. Согласно проведенным исследованиям получены следующие результаты (таблица 5).

Таблица 5. – Сравнительные результаты ПЦР различного биологического материала от свиней 90–100 и 120–150 дней

№ п/п	Носовая слизь	C(t) (пороговый цикл)	Фекалии	C(t) (пороговый цикл)	Сыворотка крови	C(t) (пороговый цикл)
свиньи, возраст 90–100 дней						
1	отрицательно	34,39	положительно	27,15	отрицательно	-
2	положительно	29,21	положительно	29,82	отрицательно	-
3	положительно	24,66	положительно	24,60	положительно	29,46
4	положительно	29,16	положительно	22,45	отрицательно	29,36
5	положительно	26,83	положительно	25,37	отрицательно	28,53
свиньи, возраст 120–150 дней						
6	положительно	25,49	положительно	26,50	отрицательно	-
7	положительно	24,99	положительно	29,33	положительно	гемолиз 32,58
8	положительно	30,34	положительно	28,12	положительно	26,75
9	положительно	28,15	положительно	23,25	положительно	31,0
10	положительно	27,77	отрицательно	37,96	положительно	26,30

Нами установлено, что для прижизненной диагностики и оценки ситуации по инфицированности цирковирусом второго типа в хозяйстве подходят все три биологических объекта, однако количество геном-эквивалента в сыворотке крови значительно ниже, чем в носовой слизи и фекалиях. При подсчете среднего арифметического Ct в пробах следует отметить, что в возрасте 90–100 дней количество вирусного генома выше, чем в более старшем возрасте, в фекалиях (25,87 и 29,32 соответственно), тогда как в носовой слизи среднее арифметическое Ct отличается незначительно (28,85 и 27,35 соответственно). В крови прослеживается похожая тенденция (29,11 и 29,15). Следует отметить, что и фекалии, и носовая слизь пригодны для мониторинговых исследований. А при рассмотрении возможности использования биологического материала для диагностики КРЗС (комплекса респираторных заболеваний свиней) носовая слизь имеет преимущества, что связано с тропизмом основных возбудителей.

Кроме того, проведены исследования патологического материала от свиней

разного возраста. Нами установлено, что наибольшее количество вирусного генома обнаружено в патологическом материале от свиней группы 90 дней (Ct 20,64). Однако количество генома и в остальных группах животных свидетельствует о неблагополучии по данной инфекции.

Изучение 14 проб спермы и 2 проб тестикулярной жидкости показало (таблица 6), что в 7 пробах спермы (50 %) и 1 пробе тестикулярной жидкости обнаружен геном цирковируса второго типа. Согласно калибровочным кривым и сравнительной валидации с количественной тест-системой «Real-Time PCR PCV-2» (Корея) на Ct 23 цикле соответствуют 10^6 копий/мл геном-эквивалента вируса, что достаточно для развития инфекционного процесса. Проведенные исследования указывают на то, что в сперме 1 хряка (№ 4) количество геном-эквивалента соответствовало наличию инфекционного процесса в организме (21,43 соответственно), у остальных животных результаты ПЦР свидетельствовали о носительстве данного патогена.

Таблица 6. – Сравнительные результаты ПЦР спермы и тестикулярной жидкости от хряков

№ п/п	Результаты	C(t) (пороговый цикл)
1	положительно	35,03
2	отрицательно	-
3	отрицательно	-
4	положительно	21,23
5	положительно	35,95
6	положительно	33,40
7	положительно	31,42
8	отрицательно	-
9	отрицательно	-
10	отрицательно	-
11	отрицательно	-
12	отрицательно	37,92
13	положительно	33,29
14	положительно	33,86
15	положительно	33,09
16	отрицательно	39,28
К+		10,56
К-		-

Следует предположить, что передача цирковируса второго типа возможна половым путем, и необходимо проводить дополнительные исследования на наличие генома спермы хряков-производителей. Соответственно, сперма также является биологическим объектом для проведения ПЦР-исследования с целью выявления возбудителя цирковируса второго типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цирковирус второго типа выделялся из патологического материала от свиней

всех возрастов, что свидетельствует о циркуляции вируса в хозяйстве.

Изученная нами сложная патолого-анатомическая картина свидетельствует о наличии смешанной инфекции и других патогенов и требует более детального изучения в дальнейшем.

ЦВС-2 выделялся из всех видов биологического материала, используемых в нашем исследовании. Наиболее технологичны и менее инвазивны для прижизненной диагностики ЦВИ второго типа носовая слизь и фекалии.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Красникова, Е. Л. Использование ПЦР реал-тайм в мониторинге патологии свиней, вызванной цирковирусом второго типа / Е. Л. Красникова, А. Л. Садовский // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2022. – № 2. – С. 30–34.
2. Brockmeier, S. L. Polymicrobial diseases / S. L. Brockmeier, P. G. Halbur, E. L. Thacker // ASM Press, Washington DC. – 2002. – С. 231–258.
3. Harms, P. A. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection / P. A. Harms, P. G. Halbur, S. D. Sorden // Journal of Swine Health and Production. – 2002. – Т. 10. – №. 1. – С. 27–30.
4. Chae, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases / C. Chae // The Veterinary Journal. – 2005. – Т. 169. – № 3. – С. 326–336.
5. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease / J. Gillespie [et al.] // Journal of veterinary internal medicine. – 2009. – Т. 23. – № 6. – С. 1151–1163.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ С АДГЕЗИВНЫМИ АНТИГЕНАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА ПОРОСЯТ



**ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ
ГЛУБОКО СУПОРОСНЫХ
СВИНОМАТОК И,
ПРИ ПОКАЗАНИЯХ,
ПОРΟΣЯТ-СОСУНОВ
С 20–30-ДНЕВНОГО
ВОЗРАСТА**

**Штаммы бактерий
ESCHERICHIA COLI
с адгезивными антигенами
F41, K88 (F4), K99 (F5),
987 P (F6), LT-токсоид**

**Защитный титр
колостральных антител
сохраняется у новорожденных
поросят до 30-дневного возраста**



WWW.BIEVM.BY