

УДК 619:578.822.2:636.4(476)

Би Кайсюань, аспирант¹Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент²¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ И ЕЕ ДИАГНОСТИКА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Резюме

Проведенные исследования показали серопозитивность стад в Республике Беларусь на уровне 96,2 %, при этом было выявлено 21,8 % положительных проб патологического материала на наличие генома парвовируса свиней. Подобранные олигонуклеотиды для выявления генома парвовируса свиней в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени обладают высокой специфичностью и чувствительностью на уровне 43 пг/мл вирусной ДНК.

Ключевые слова: парвовирус свиней, диагностика, полимеразная цепная реакция, распространение, серопозитивность.

Summary

The conducted studies showed seropositivity of herds in the Republic of Belarus at the level of 96,2 %, while 21,8 % of positive samples of pathological material for the presence of the porcine parvovirus genome were detected. The designed oligonucleotides for detection of the porcine parvovirus genome in the real time polymerase chain reaction have high specificity and sensitivity at the level of 43 pg/ml of viral DNA.

Keywords: swine parvovirus, diagnostics, polymerase chain reaction, spread, seropositeness.

Поступила в редакцию 14.05.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Свиной парвовирус (PPV), представитель семейства *Parvoviridae*, остается одной из ключевых причин репродуктивных потерь в промышленном свиноводстве. Статистические данные показывают, что в эндемичных регионах, таких как Азия и Восточная Европа, до 80 % свиноматок имеют серопозитивный статус по отношению к PPV [1]. Это напрямую связано с клиническими проявлениями, включая мумификацию плодов (15–30 % случаев) и спорадические аборт [3]. Высокая устойчивость вируса во внешней среде способствует его передаче через контаминированные корма, оборудование и транспортные средства, что осложняет меры контроля [1].

Экономический ущерб от PPV усугубляется его способностью к синергетическим взаимодействиям с другими патогенами, например с вирусом репродуктивно-респираторного синдрома (PRRSV) и

цирковирусом свиней типа 2 (PCV2). Исследования демонстрируют, что коинфекция PPV и PRRSV на 40 % повышает риск антенатальной гибели плодов по сравнению с изолированной инфекцией, что подчеркивает необходимость комплексных диагностических подходов [2, 4].

На современном этапе ведения промышленного свиноводства профилактика болезней, наносящих существенный экономический ущерб, стала неотъемлемой частью ветеринарных мероприятий. Парвовирусная инфекция свиней не является исключением, и ее профилактика обязательна для всех свинокомплексов Республики Беларусь.

Целью настоящей работы явилась разработка метода диагностики парвовирусной болезни свиней методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ и на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ.

Для оценки распространенности парвовирусной инфекции свиней использовали результаты диагностических исследований, выполненных в УО ВГАВМ в период 2018–2022 гг.

Для анализа генома использовались полногеномные последовательности штаммов парвовируса свиней (ПВС) из банка нуклеотидных последовательностей Национального центра биотехнологической информации (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Для подбора и анализа праймеров и олигонуклеотидных зондов использовали программное обеспечение PCR design tool Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) и SnapGene.

В качестве положительного контроля использовали штамм парвовируса свиней «КМИЭВ-48» (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»).

Для оценки специфичности метода в качестве положительных образцов использовали ДНК, выделенную из патологического материала (кровь, сыворотка, кусочки паренхиматозных органов от свиней и поросят) с подтвержденным наличием ДНК парвовируса с помощью коммерческих тест-систем, а также гетерогенные штаммы вирусов и бактерий, потенциально инфицирующие свиней: цирковиреус 2-го типа (изолят РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»), вирус классической чумы свиней (штамм «КМИЭВ-V113»), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (штамм «Lena»), вирус болезни Ауески (штамм «ГНКИ»), *Escherichia coli* (штамм «АТСС 25922»), *Salmonella enterica* (штамм «АТСС ВАА-2162»), *Streptococcus suis* (изолят УО ВГАВМ), *Streptococcus pneumoniae* (штамм «АТСС 49619»).

Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот: «Рибо-Преп», «Рибо-Сорб» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), «АртДНК» (ООО «АртБиоТех», РБ).

Для оценки чувствительности разработанного метода проводили предварительную очистку парвовируса свиней из культуральной жидкости с помощью полиэтиленгликоля, а после выделения ДНК ее концентрацию определяли флуориметрически с использованием прибора Qubit.

Перевод весовой концентрации в копияльную проводили с помощью онлайн-сервиса <https://nebiocalculator.neb.com/>.

Для выявления генома парвовируса свиней использовали коммерческие наборы: «Тест-система для обнаружения парвовируса свиней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (ООО «Ветбиохим», РФ) и «ГенТест Парвовирус» (ООО «ПЦР технологии», РБ) в соответствии с инструкциями по их применению. ПЦР ставили в режиме реального времени с использованием амплификатора «RotorGene 3000» в соответствии с инструкцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенные серологические исследования показали высокий уровень напряженности иммунитета. Так, при исследовании 238 сывороток крови из 7 свинок-плексов в период 2020–2022 гг. 229 были положительны на наличие специфических антител к ПВС. ПЦР-исследование патологического материала из этих хозяйств (аборт-плоды поросят, сыворотки крови свиней), поступавшего в период 2018–2022 гг., не показывало наличие генома ПВС.

Однако всегда возможны погрешности при вакцинации и снижение эффективности вакцинации на фоне стрессовых факторов, инфекционных болезней, погрешностей кормления и содержания. Подтверждением этому является наличие аборт-плодов и выявление генома ПВС не только в аборт-плодах, но и в сыворотках крови свинок-плексов. При исследовании нами 156 проб патологического материала от свиней с подозрением на парвовирусную инфекцию (наличие аборт-плодов) из 16 свинок-плексов было выявлено 34 положительные пробы, а также один положительный случай в частном подсобном хозяйстве, где не проводилась вакцинация. Таким образом, несмотря на низкий процент (21,8 %) выявления генома ПВС при абортивной патологии свиней, данный возбудитель сохраняет свою актуальность, в связи с чем требуются эф-

фективные и быстрые методы диагностики. Одним из таких методов является полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющая в течение 2-3 ч определить наличие генетического материала возбудителя в исследуемых пробах.

Для разработки метода выявления генома ПВС был проведен его анализ, который показал, что генетический материал вируса состоит из одноцепочечной ДНК длиной около 5 тыс. нуклеотидов. Геном ПВС организован из двух основных открытых рамок считывания (ORF):

- ORF1 – кодирует неструктурные белки NS1 и NS2, ответственные за репликацию ДНК и модуляцию клеточного цикла;
- ORF2 – кодирует структурные белки VP1 и VP2, формирующие капсид. VP2, составляющий 90 % капсида, содержит иммунодоминантные эпитопы, что делает его мишенью для диагностических антител.

С помощью программного обеспечения были подобраны праймеры и олигонуклеотидный зонд к гену VP2, ограничивающие фрагмент длиной 89 п.н. Их последовательности отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов к парвовирусу свиней

Шифр олигонуклеотида	Последовательность	Длина	Температура плавления, °C	GC состав, %
PPVR	AGTGTTCCTTTCCACCAAAAGT	22	63,9	41
PPVF	GCACCAAACCTAACAGATGATTTC	24	64,2	42
PPVZ	TGCTGACTCTCCTCAACAACCT	22	67,3	50

Как видно из свойств праймеров, температура их отжига находится примерно на одинаковом уровне, а температура отжига олигонуклеотидного зонда несколько выше, чем у праймеров, что обеспечит достоверный отжиг.

Для оценки специфичности праймеров и подбора оптимальных условий реакции провели постановку ПЦР с заведомо положительным образцом (ДНК из штамма парвовируса свиней) при различных температурно-временных циклах.

Состав реакционной смеси следующий: ArtMix ДНК-полимераза – 12,5 мкл (ООО «АртБиоТех», РБ), праймеры и олигонуклеотидный зонд – по 10 пмоль, деионизированная вода – до 20 мкл, ДНК-матрица – 5 мкл.

В качестве базового температурно-временного цикла использовали следующий: 1 цикл – денатурация при 95 °C – 2 мин;

40 циклов, состоящих из денатурации при температуре 95 °C – 10 с, отжига при температуре 60 °C – 15 с, элонгации при температуре 67 °C – 15 с. Учет флуоресценции проводили после стадии отжига.

В результате постановки реакции было определено, что подобранные пары праймеров и олигонуклеотидный зонд выявляют геном ПВС.

На следующем этапе подбирали оптимальные условия реакции. Для этого провели постановку ПЦР с различными концентрациями праймеров и олигонуклеотидного зонда: по 15 пмоль праймеров и зонда, по 10 пмоль праймеров и 5 пмоль зонда, по 5 пмоль праймеров и зонда. Для каждого условия положительную пробу ставили в 3 повторностях, результат оценивали по пороговому циклу и относительному уровню флуоресценции в конце реакции. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты подбора оптимальной концентрации олигонуклеотидов

Концентрация олигонуклеотидов	Среднее значение порогового цикла	Среднее значение уровня флуоресценции
15 пмоль праймеров и зонда	16,60	0,48
10 пмоль праймеров и зонда	17,52	0,58
10 пмоль праймеров и 5 пмоль зонда	15,83	0,63
5 пмоль праймеров и зонда	15,85	0,49

Полученные результаты показали, что при всех концентрациях удается получить положительный результат. Изменение концентрации олигонуклеотидов несущественно влияет на значение порогового цикла – для всех условий он находится на уровне 15–17 циклов. Уровень флуоресценции при этом подвержен большей вариабельности: от 0,48 до 0,63 относительных единиц флуоресценции (ОЕФ).

Таким образом, оптимальной была выбрана концентрация олигонуклеотидов 10 пмоль праймеров и 5 пмоль зонда, при

которой отмечается наименьший пороговый цикл и наиболее высокий уровень флуоресценции.

Оптимизацию температурно-временных циклов проводили путем постановки ПЦР при различных температурах отжига праймеров и длительности отдельных этапов цикла. Концентрацию олигонуклеотидов использовали из результатов подбора оптимальной концентрации. Условия отработки и результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты подбора оптимальных температурно-временных циклов

Условия реакции	Среднее значение порогового цикла	Среднее значение уровня флуоресценции	Время реакции, мин
95 °C – 10 с 58 °C – 15 с 67 °C – 15 с	16,39	0,64	73
95 °C – 10 с 59 °C – 15 с 67 °C – 15 с	16,57	0,62	72
95 °C – 10 с 61 °C – 15 с 67 °C – 15 с	16,46	0,58	70
95 °C – 10 с 62 °C – 15 с 67 °C – 15 с	16,56	0,55	69
95 °C – 10 с 60 °C – 15 с	17,52	0,58	60

Примечание – реакция включала 40 циклов с 1 циклом предварительной денатурации при температуре 95 °C – 2 мин

Как видно из таблицы 3, уровень флуоресценции практически при всех условиях проведения реакции находится на одинаковом уровне – 0,55–0,64. Несколько хуже реакция идет при температуре 62 °C, но даже этот уровень приемлем для достоверной оценки результатов.

Что касается значения порогового цикла, то все трехстадийные ПЦР имеют практически одинаковое значение, а двухстадийная отстает от них примерно на 1 цикл.

Таким образом, проведенный опыт показал, что оптимальными условиями проведения реакции является трехстадийная ПЦР с отжигом в диапазоне 58–62 °C.

Для оценки чувствительности метода была поставлена ПЦР с десятикратными

разведениями двух образцов выделенной ДНК парвовируса (таблица 4). Исходя из представленных данных, чувствительность разработанного метода составляет в среднем 43 пг/мл.

Для перевода пг/мл в копии на мл использовали последовательность генома парвовируса свиней и полученную чувствительность. В результате получили соответствие 43 пг/мл 8×10^3 копий/мл.

Для оценки специфичности разработанного метода была проведена ПЦР с использованием ДНК из положительного и отрицательного на наличие парвовируса свиней патологического материала, гетерогенных штаммов вирусов и бактерий, потенциально инфицирующих свиней. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 4 – Оценка чувствительности метода выявления парвовируса свиней

Концентрация ПВС в исходном образце № 1, г/мл	Результат реакции	Концентрация ПВС в исходном образце № 2, г/мл	Результат реакции
$3,0 \times 10^{-8}$	положительно	$5,6 \times 10^{-7}$	положительно
$3,0 \times 10^{-9}$	положительно	$5,6 \times 10^{-8}$	положительно
$3,0 \times 10^{-10}$	положительно	$5,6 \times 10^{-9}$	положительно
$3,0 \times 10^{-11}$	положительно	$5,6 \times 10^{-10}$	положительно
$3,0 \times 10^{-12}$	положительно	$5,6 \times 10^{-11}$	положительно
$3,0 \times 10^{-13}$	положительно	$5,6 \times 10^{-12}$	положительно
$3,0 \times 10^{-14}$	сомнительно	$5,6 \times 10^{-13}$	положительно
$3,0 \times 10^{-15}$	отрицательно	$5,6 \times 10^{-14}$	сомнительно
		$5,6 \times 10^{-15}$	отрицательно

Таблица 5 – Выявление генома парвовируса свиней разработанным методом

Наименование образца	Количество	Количество положительных результатов (собственный метод)	Количество положительных результатов (коммерческие тест-системы)
Сыворотка крови	20	8	8
Патологический материал	23	17	17
Штамм парвовируса	1	1	1
Цирковирс 2 типа	1	0	0
Вирус классической чумы свиней	1	0	0
Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней	1	0	0
Вирус болезни Ауески	1	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	1	0	0
<i>Streptococcus suis</i>	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0

Как видно из таблицы, разработанный метод выявления генома ПВС позволяет подтверждать наличие генома искомого вируса не только в штаммах данного вируса, но и в патологическом материале, на

уровне специфичности, не уступающем коммерческим тест-системам. При этом выявления гетерогенных вирусов и бактерий, потенциально инфицирующих свиней, не происходит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проводимая в Республике Беларусь обязательная вакцинация против парвовирусной инфекции свиней обеспечила, по результатам наших исследований, серопозитивность стад на уровне 96,2 %. Однако ПЦР-исследования в период 2018–2022 гг. показали наличие 21,8 % положительных проб, что свидетельствует о циркуляции в свинокомплексах Республики Беларусь патогенных штаммов, вызывающих репродуктивную патологию свиней. Разработанный метод выявления генома парвовируса

свиней обладает чувствительностью на уровне 8×10^3 копий/мл (43 пг/мл) вирусной ДНК и позволяет подтверждать наличие генома искомого вируса не только в штаммах данного вируса, но в патологическом материале, не выявляя при этом гетерогенных вирусов и бактерий. Широкий диапазон температуры отжига праймеров, без потери основных качественных показателей реакции (пороговый цикл, уровень флуоресценции) позволит использовать его для разработки мультиплексного метода ПЦР-диагностики.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Максимович, В. В. Инфекционные болезни свиней / В. В. Максимович ; Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2 изд., перераб. и доп. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2011. – 340 с.
2. Мальцева, Б. М. Смешанное течение репродуктивно-респираторного синдрома и парвовирусной инфекции свиней / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 1. – С. 230.
3. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals : Porcine Parvovirus.* – Paris : OIE Press, 2020.
4. Co-infection dynamics of porcine parvovirus and PRRSV in European swine herds / I. Mészáros [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 2019. – 231. – P. 87–94.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ С АДГЕЗИВНЫМИ АНТИГЕНАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА ПОРОСЯТ



**ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ
ГЛУБОКО СУПОРОСНЫХ
СВИНОМАТОК И,
ПРИ ПОКАЗАНИЯХ,
ПОРОСЯТ-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