

ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕПРОДУКТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ СВИНЕЙ: ПАРВОВИРУСА И ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА

А.Д. Козлова, научный сотрудник

ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

тел. 8-903-254-96-90, kozlova-aleksandra@yandex.ru

Т.С. Астахова, кандидат биологических наук, научный сотрудник

ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»

(495)974-96-46, Tatiana.Astahova@pcr.ru

И.Л. Обухов, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биотехнологии

ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»,

(499) 253-14-73, obukhov@vgnki.ru

Ключевые слова: цирковироз свиней 2 типа, парвовирус свиней, вирус РРСС, ПЦР в «реальном времени»

Распространенными вирусными этиологическими агентами репродуктивных нарушений свиней являются парвовирус (ПВС) и вирус репродуктивно-респираторного синдрома (РРСС), которые часто осложняются цирковирусом 2 типа. Для выявления данных вирусов в разном биологическом материале разработаны тест-системы для выявления ДНК ПВС и ЦВС, а также генотипирования вируса РРСС методом ПЦР в режиме «реального времени».

Введение. Репродуктивные патологии свиноматок наносят значительный экономический ущерб промышленному свиноводству. Важную роль среди вирусных этиологических агентов репродуктивных нарушений играют парвовирус свиней и вирус РРСС [1].

Парвовирус свиней – представитель рода *Parvovirus*, семейства *Parvoviridae*, устойчивый к внешним неблагоприятным факторам. Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) – заболевание, проявляющееся репродуктивными нарушениями у супоросных свиноматок. У других групп животных в большинстве случаев протекает бессимптомно [2,3], но может быть причиной диарей [4,5], кожных поражений [6] и артритов у свиней [4,2].

Возбудителем РРСС является вирус рода *Arterivirus*, семейства *Arteriviridae*. Различают два генотипа данного вируса: европейский и американский. Гомология между ними на нуклеотидном уровне составляет 55-67% [7]. До 2006 г. в России наблюдалась циркуляция вируса только европейского генотипа [8], но с 2007г. регистрируются вспышки заболевания, вызванные вирусом РРСС американского генотипа [9, 10].

Для специфической профилактики РРСС применяются живые и инактивированные вакцины, содержащие только один из генотипов вируса. Иммуитет к РРСС генотипоспецифичен, поэтому важно не только обнаружение вируса в хозяйстве, но и его генотипирование.

Парвовирус и вирус РРСС проявляются схожими репродуктивными нарушениями: абортами, рождением мертвых, мумифицированных и нежизнеспособных поросят, погибающих в первые месяцы жизни. Кроме того, возможно коинфицирование животного вирусами РРСС и ПВС [11]. Также данные заболевания часто осложняются вторичными бактериальными и вирусными инфекциями. Наиболее распространенным патогеном, регистрируемым при смешанных инфекциях, является цирковироз свиней 2 типа (ЦВС-2). В результате иммуносупрессорного действия ЦВС-2 [12], осложненные им РРСС или ПВИС протекают значительно тяжелее и не поддаются лечению [13].

ЦВС, ПВС и РСС могут протекать в форме бессимптомного носительства. При этом животные-вирусоносители выделяют вирус в окружающую среду и являются источниками заражения здоровых животных. Все вышесказанное не позволяет диагностировать эти заболевания на основании только эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных без использования современных методов лабораторной диагностики.

Классическим методом диагностики вирусных патогенов является вирусовыделение на культуре клеток, но этот метод длителен, дорогостоящ и трудоемок. В РФ широко применяются ИФА и РТГА для обнаружения специфических антител. Но эти методы не дифференцируют поствакцинальные антитела от постинфекционных, и не позволяют выявлять вирусоносителей при обследовании вакцинированного поголовья. Обнаружение вирусных антигенов методами ИФА и РГА не может использоваться при исследовании спермы. В настоящее время большую популярность приобретает полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, обладающий высокой специфичностью, чувствительностью и позволяющий выявлять вирусный геном даже при низкой вирусной нагрузке в любом биологическом материале.

В связи с этим **целью** нашей работы являлась разработка ПЦР-тест-систем с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» для выявления парвовируса, цирковируса свиней 2 типа и генотипирования возбудителя РСС и их применение в диагностике репродуктивных патологий свиней.

Материалы и методы исследований.

Штаммы и изоляты. В работе использовали штаммы ЦВС (НПО Нарвак), ПВС (шт. ВЛ-94), вируса РСС (шт. БД американского генотипа, шт. VP046 европейского генотипа), вируса болезни Ауески (шт. ГНКИ, Арский, МБА), классической чумы свиней (шт. Синлак, ГМ-94), трансмиссивного гастроэнтерита (НПО Нарвак); кДНК из положительных образцов, содержащих вирус эпидемической диареи свиней; ДНК генома свиньи.

Биологический материал. Проводилось тестирование клинического (фекалии, сыворотка крови, сперма) и патологического (селезенка, лимфатические узлы, легкие, печень, кишечник, аборт-плоды) материала от свиней. Биологический материал получен из нескольких хозяйств Белгородской и Ростовской областей в период с октября 2008 по ноябрь 2010.

Выделение суммарной РНК/ДНК из материала проводили набором «Рибо-преп» (Amplisens, ФГУН «ЦНИИЭ»), согласно инструкции.

Амплификацию проводили на приборах с флуоресцентным методом детекции в режиме «реального времени» RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) и iQCyler (BioRad, США) с использованием реактивов Amplisens (ФГУН «ЦНИИЭ»).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате анализа литературных данных и нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, в качестве генов-мишеней для подбора праймеров и зондов выбраны: для ЦВС-2 – ген ORF1, для ПВС – ген NS1, для дифференцирования европейского и американского генотипа вируса РСС – ген ORF7.

Специфичность всех пар праймеров проверялась на штаммах и кДНК, указанных в разделе «Материалы и Методы». В результате экспериментов доказана специфичность работы праймеров.

Определение аналитической чувствительности тест-систем проводилось на рекомбинантных положительных контролях (ПКО). Контроли для тест-системы, дифференцирующей РНК вируса РСС американского и европейского генотипов, получены путем клонирования участка гена-мишени в ms2 фаг, а для тест-систем, обнаруживающих ДНК цирковируса и парвовируса – в фаг λ . Эксперимент проведен на панелях образцов сыворотки крови (только для РСС), суспензий фекалий, патматериала (смесь разных внутренних органов) и спермы, содержащих 5×10^4 , 5×10^3 , 10^3 и 5×10^2 коп/мл рекомбинантного контроля.

Чувствительность тест-системы, выявляющей РНК вируса РСС, составила при исследовании сыворотки крови – 10^3 коп/мл, суспензий фекалий и патматериала – 5×10^3 коп/мл, спермы – 5×10^4 коп/мл для каждого генотипа. Чувствительность тест-систем, обнаруживающих ДНК ЦВС и ПВС, при тестировании суспензии фекалий и патматериала составила 5×10^2 коп/мл, а при исследовании спермы

– 5×10^3 коп/мл.

Для обеспечения контроля качества и предотвращения получения ложноотрицательных результатов во все тест-системы введен внутренний контрольный образец (ВКО), который вносится в каждую пробу на этапе экстракции нуклеиновых кислот, что позволяет контролировать качество выполнения всех этапов ПЦР-исследования. Амплификация и детекция данного препарата происходит с помощью отдельной пары праймеров и зонда одновременно с амплификацией специфической мишени.

Следующим этапом работы было исследование биологического материала, полученного из 17 хозяйств Белгородской и Ростовской областей. Всего исследовано 312 образцов.

Результаты исследований на ПВС и вирус РРСС представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Результаты обнаружения ДНК ПВС методом ПЦР в «реальном времени»

	Всего образцов	Количество образцов, содержащих ДНК ПВС	Количество образцов ПВС, коинфицированных ЦВС-2
аборт. плод	59	2 (3,4%)	2
сперма	20	0	0
патматериал	75	16 (21,3%)	16
легкое	27	5 (18,5%)	5
кишечник	8	2 (25%)	2
сыворотка	18	0	0
фекалии	105	15 (13,4%)	14
Итого	312	40 (12,8%)	39 (97,5%)

Таблица 2. Результаты выявления РНК вируса РРСС методом ПЦР в «реальном времени»

	Всего образцов	Количество образцов, содержащих РНК РРСС	Количество образцов содержащих РНК РРСС и ДНК ЦВС
патматериал	75	7	4
фекалии, сыворотка, аборт. плоды, сперма	237	0	0
Итого	312	7 (2,2%)	4

Репродуктивные нарушения, вызываемые данными вирусами, проявляются абортами на разных сроках супоросности. С помощью разработанных тест-систем исследовано 59 абортированных плодов. ПВС выявлен в 2 исследованных образцах этого материала, что составляет 3,4%.

У хряков ПВС и вирус РРСС выделяются со спермой [14] и, при искусственном осеменении, могут заражать здоровых животных. Поэтому важной задачей является обнаружение вирусов в сперме. В 20 исследованных нами образцах вируса РРСС и парвовирус обнаружены не были.

Известно, что при коинфицировании поросят ПВС и ЦВС-2 наблюдается синергетическое влияние данных возбудителей, нередко приводящее к летальному исходу [13,15]. В нашем случае при тестировании патматериала от поросят в возрасте от 3 до 180 дней сочетанная инфекция ПВС + ЦВС-2 наблюдалась в 100% случаях. В 2 образцах патматериала были одновременно обнаружены ДНК ЦВС-2, ПВС и РНК РРСС европейского генотипа.

Для ПВС и вируса РРСС характерна персистирующая инфекция, при которой животные не проявляют клинических признаков, но выделяют вирус в окружающую среду и заражают здоровых животных. Для выявления бессимптомно инфицированных животных проводится исследование сывороток крови и/или фекалий. В образцах сыворотки крови, протестированной в нашей лаборатории ПВС и вирус РРСС не обнаружены. ПВС выявлен в 15 пробах из 3 хозяйств, что составляет 13,4% от общего количества исследованных образцов фекалий.

Тест-система генотипирующая РНК вируса РРСС использовалась во время вспышки данного заболевания в Белгородской области в июле 2010 года. Нами исследовано 25 образцов: 3 пробы аборт-плодов, 1 плаценты, 4 патматериала и 1 легкого от павших животных и 16 сывороток крови от поросят,

подозрительных на РРСС по клинической картине. Отрицательными оказались 2 пробы абортплодов, 1 патматериала и легкое. Во 21 пробе, что составляет 84% исследованных образцов, обнаружен вирус РРСС европейского генотипа. Результаты ПЦР-исследования подтверждены секвенированием. Коинфицирования ЦВС-2 и ПВС в этих образцах не обнаружено.

Заключение.

Проведен эпизоотический мониторинг 17 хозяйств Белгородской и Ростовской областей с помощью разработанных тест-систем для выявления ДНК возбудителей ЦВС-2 и ПВС и генотипирования вируса РРСС методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени». Данный метод позволяет использовать для исследования разные виды биологического материала.

Библиографический список:

1. Ковалишин В.Ф. Диагностика инфекционных болезней импортируемых в Россию свиней// Материалы Международной конференции «инновационные пути развития свиноводства в России», Москва, МПА, 2009, с. 77-85
2. Chen H.-Y., Li X.-K., Cui B.-A., et al. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus//Journal of Virological Methods, Vol.№156, 2009, p. 84–88.
3. Nielsen J., Ronsholt L., Sorensen K.J. Experimental in utero infection of pig fetuses with porcine parvovirus (PPV)// Vet.Microbiol., Vol.28, 1991, p. 1-11.
4. Bergeron J., Hebert B., Tijssen P. Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with Those of NADL-2 and Field Isolates// Journal of Virology, Apr. 1996, p. 2508–2515.
5. Dea S., Elazhary M.A.S.Y., Martineau G.P. et al. Parvovirus-like Particles Associated with Diarrhea in Unweaned Piglets//Can. J. Comp. Med., Vol.49, 1985, p. 343-345.
6. Whitaker H.K., Neu S.M., Pace L.W. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease//J. Vet. Diagn. Invest. Vol.2(3), 1990, p.244-246.
7. Meng X.J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development//Veterinary Microbiology, Vol.74, 2000, p.309-329.9.
8. Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe// Arch. Virol. Vol.153, 2008, p.1479–1488.
9. http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=6410.
10. Русалеев В.С. Проблемы и перспективы вакцинопрофилактики актуальных бактериальных инфекций свиней на свинокомплексах Российской Федерации// Российский Ветеринарный Конгресс, секция Проблемы инфекционной патологии свиней, 2010 (<http://www.narvac.com/vetdoc/files/files/3.html>).
11. Ануфриев П.А., Першина С.И. Клинико-эпизоотологический мониторинг при применении вакцин против РРСС + ПВИС и ТГС// Ветеринарная патология, том № 3, 2003, с.46-48.
12. Darwich, L., J. Segale's, M. Domingo et al. Changes in CD4+, CD8+, CD4+ CD8+, and Immunoglobulin M-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome-Affected Pigs and Age-Matched Uninfected Wasted and Healthy Pigs Correlate with Lesions and Porcine Circovirus// Clin. Diagn. Lab. Immunol., Vol.9(2), 2002, p. 236–242.
13. Sharma R., Saikumar G. Porcine parvovirus- and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs// Trop. Anim. Health. Prod. Vol.42, 2010, p.515–522.
14. Guérin B., Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination//Theriogenology, Vol.63, 2005, p.556–572.
15. Krakowka S., Ellis J.A., Meehan B., et al. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus// Vet. Pathol. Vol.37(3), 2000, p. 254-263.