Научная статья
УДК 619:616.98:578:636.4
doi:10.35694/YARCX.2025.70.2.016

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И ДИАГНОСТИКА ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Кайсюань Би
Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
Витебск, Республика Беларусь
bikaixuan1213@163.com

Реферат. Свиной цирковирус 2 типа (ЦВС-2) широко распространён по всему миру и обнаружен практически во всех регионах, где разводят свиней. Свиной цирковирус 2 типа связан с рядом заболеваний у свиней, известных как цирковирус-ассоциированные заболевания свиней (PCVD). Эти заболевания включают мультисистемный истощающий синдром у поросят после отъёма, синдром дерматита и нефропатии, репродуктивные нарушения, а также другие респираторные и желудочно-кишечные заболевания. Целью настоящей работы явилась оценка распространённости и разработка метода диагностики цирковирусной инфекции свиней (ЦВС-2) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Проведённые исследования по оценке распространённости цирковирусной инфекции свиней показали серопозитивность стад в Республике Беларусь на уровне 79,5%, при этом было выявлено 18,9% положительных проб патологического материала на наличие генома цирковируса свиней 2 типа. При разработке метода диагностики цирковирусной инфекции в ПЦР для постановки реакции использовали стандартный температурно-временной цикл с учётом температур плавления праймеров и зонда: денатурация при 95°С – 2 мин (1 цикл), денатурация при 95°С – 10 сек., отжиг при 60°С – 15 сек., элонгация при 67°С – 15 сек. (40 циклов). Оптимальными условиями проведения реакции является ПЦР с отжигом при 59 и 61°С. Оптимальной концентрацией олигонуклеотидов была выбрана по 5 пмоль праймеров и зонда, при которой отмечается наибольшая чувствительность реакции. Подобранные олигонуклеотиды для выявления генома цирковируса свиней 2 типа в полимеразной цепной реакции в «реальном времени» обладают высокой специфичностью и чувствительностью – на уровне 6,4 ГЭ/мкл вирусной ДНК.

Ключевые слова: *цирковирус свиней, полимеразная цепная реакция, распространение, серопозитивность*

PREVALENCE AND DIAGNOSTICS OF CIRCOVIRUS INFECTION OF PIGS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Kaixuan Bi
Vitebsk Order of the Badge of Honour State Academy of Veterinary Medicine,
Vitebsk, Republic of Belarus
bikaixuan1213@163.com

Abstract. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is widespread around the world and is found in almost all regions where pigs are bred. Porcine circovirus type 2 is associated with a number of diseases in pigs known as porcine circovirus-associated diseases (PCVD). These diseases include multisystem wasting syndrome in piglets after weaning, dermatitis and nephropathy syndrome, reproductive disorders, as well as other respiratory and gastrointestinal diseases. The purpose of this work was to assess the prevalence and develop a method for diagnosing porcine circovirus infection (PCV-2) by polymerase chain reaction (PCR) in real time (RT-PCR). Studies conducted to assess the prevalence of porcine circovirus infection showed seropositivity of herds in the Republic of Belarus at the level of 79.5%, while 18.9% of positive samples of pathological material for the presence of the porcine circovirus genome type 2 were detected. When developing a method for diagnosing porcine circovirus infection in PCR, a standard temperature-time cycle was used to establish the reaction, taking into account the melting points of the primers and probe: denaturation at 95°C – 2 min (1 cycle), denaturation at 95°C – 10 sec., annealing at 60°C – 15 sec., elongation at 67°C – 15 sec. (40 cycles). The optimal reaction conditions are PCR with annealing at 59 and 61°C. The optimal concentration of

oligonucleotides was selected by 5 pmol of primers and a probe, at which the highest sensitivity of the reaction is noted. The selected oligonucleotides for detection of the porcine circovirus type 2 genome in the polymerase chain reaction in "real time" have high specificity and sensitivity – at the level of 6.4 GE/μl of viral DNA.

Keywords: *porcine circovirus, polymerase chain reaction, spreading, seropositivity*

Введение. Свиной цирковирус 2 типа (ЦВС-2) широко распространён по всему миру и обнаружен практически во всех регионах, где разводят свиней. Возникновение и вспышки болезни часто связаны с регионами интенсивного свиноводства. Благодаря высокой заразности, этот вирус быстро распространился в различные страны и регионы. С развитием современных методов интенсивного животноводства скорость и масштаб распространения цирковирусной инфекции свиней значительно возросли. Хотя эпидемиологическая ситуация различается в зависимости от региона, влияние ЦВС-2 зафиксировано в большинстве ведущих стран по производству свинины [1; 2].

Свиной цирковирус 2 типа связан с рядом заболеваний у свиней, известных как цирковирус-ассоциированные заболевания свиней. Эти заболевания включают мультисистемный истощающий синдром у поросят после отъёма, синдром дерматита и нефропатии [4], репродуктивные нарушения, а также другие респираторные и желудочно-кишечные заболевания. Экономический ущерб складывается из недополучения потомства, обусловленного репродуктивными нарушениями у свиноматок, получения слабого, отстающего в росте потомства и затрат на лечение больных животных [1]. Ситуацию может усугублять ассоциированное течение болезни с другими вирусами (например, репродуктивно-респираторный синдром свиней) [3]. В связи с этим необходимо иметь эффективные диагностические средства для постановки диагноза и последующей разработки профилактических мер.

Целью настоящей работы явилась оценка распространённости и разработка метода диагностики цирковирусной инфекции свиней (ЦВС-2) методом ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

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

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

Для анализа генома использовались полногеномные последовательности штаммов парвовируса свиней 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 designtool Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) и SnapGene.

В качестве положительного контроля использовали изолят цирковируса свиней 2 типа (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 подтверждённым наличием ДНК цирковируса свиней 2 типа с помощью коммерческих тест-систем, а также гетерогенные штаммы вирусов и бактерий, потенциально инфицирующие свиней (парвовирус свиней (КМИЭВ-48), вирус классической чумы свиней (КМИЭВ-V113), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (штамм «Lena»), вирус болезни Ауески (штамм «ГНКИ»), *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC BAA-2162), *Streptococcus suis* (изолят УО ВГАВМ), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619).

Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот: «Рибо-Преп», «Рибо-Сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «АртДНК» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь).

Для выявления генома ЦВС-2 использовали коммерческие наборы: «Тест-система для обнаружения цирковируса свиней 2 типа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (ООО «Ветбиохим», Россия) и «ГенТестЦирковирус» (ООО «ПЦР технологии», Республика Беларусь).

Обнаружение генома ЦВС-2 проводили в соответствии с инструкциями по применению диагностических наборов.

ПЦР ставили с использованием амплификатора в «реальном времени» «RotorGene 3000». Учёт реакции проводили в соответствии с инструкциями к диагностическим наборам.

Результаты исследований. Изучение распространённости цирковирусной инфекции свиней при проведении серологических исследований в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней УО ВГАВМ (ранее лаборатории биотехнологии научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ) показало высокий уровень серопозитивности стад. При исследовании 268 сывороток крови из 8 свинокомплексов в период 2020–2022 гг. 213 были положительны на наличие специфических антител к ЦВС-2. Таким образом, серопозитивность стад составляет 79,5%.

Нами также были проведены диагностические исследования по выявлению генома ЦВС-2 в патологическом материале от поросят и свиней с подозрением на цирковирусную инфекцию (наличие абортов, получение слабого приплода, отставание в росте поросят). При исследовании 227 проб патологического материала в период 2018–2022 гг. были выявлены 43 положительные пробы. Несмотря на невысокий процент положительных проб (18,9%), обращает внимание на себя тот факт, что в большинстве случаев при исследовании паренхиматозных органов, поступивших из одного хозяйства, 75–100% проб являются положительными, что свидетельствует о высокой степени вирусоносительства.

Для разработки метода выявления генома ЦВС-2 был проведён анализ последовательности его ДНК, который показал, что генетический материал вируса состоит из одноцепочечной ДНК длиной около 1,8 тыс. нуклеотидов. Геном вируса организован из двух основных открытых рамок считывания (ORF):

– ORF1: кодирует неструктурный белок, ответственный за синтез репликазы.

– ORF2: кодирует структурный капсидный белок, содержит иммунодоминантные эпитопы, что делает его мишенью для диагностических антител.

С помощью программного обеспечения были подобраны праймеры и олигонуклеотидный зонд к открытой рамке считывания 2, ограничивающие фрагмент длиной 89 п.н. Их последовательности отражены в таблице 1.

Как видно из свойств олигонуклеотидов, их температура отжига находится примерно на одинаковом уровне, что должно обеспечить достоверный отжиг.

Для оценки специфичности праймеров и подбора оптимальных условий реакции провели постановку ПЦР с заведомо положительным образцом (ДНК из изолята цирковируса свиней 2 типа) при различных температурно-временных циклах.

Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: праймеры и олигонуклеотидный зонд по 10 пмоль, 2х ArtMix ДНК-полимераза 12,5 мкл (АртБиоТех, РБ), деионизированная вода до 20 мкл, выделенная ДНК 5 мкл.

Использовали стандартный температурно-временной цикл с учётом температур плавления праймеров и зонда: денатурация при 95°С – 2 мин (1 цикл), денатурация при 95°С – 10 сек., отжиг при 60°С – 15 сек., элонгация при 67°С – 15 сек. (40 циклов). Флуоресценцию учитывали по завершении стадии отжига.

Постановка реакции показала положительный результат, что свидетельствует о специфичности праймеров и зонда геному ЦВС-2.

Далее провели оптимизацию условий реакции в отношении концентрации специфических компонентов. Для этого выполнили несколько ПЦР с различными вариантами концентрации праймеров и зонда. В качестве ДНК-матрицы использовали выделенную нуклеиновую кислоту из изолята ЦВС-2. Для исключения погрешностей пипетирования и увеличения достоверности данных для каждого из условий реакции пробу ставили в 3-х повторах. Оценка результата проводилась по значению порогового цикла и конечной величине относительного уровня флуоресценции (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, все варианты концентраций дают приемлемый результат как порогового цикла (от 24,5 до 25,7), так и относительного уровня флуоресценции (от 0,50 до 0,58). При этом наименьшее значение порогового цикла

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов к парвовирусу свиней

Шифр олигонуклеотида	Последовательность	Длина	Температура плавления, °С	GC состав, %
CVS2F1F2	GGAACTGTGCCTTTTTTGGC	20	62,5	50,0
CVS2R1R2	AGCTTCTACAGCTGGGACAG	20	63,3	55,0
CVS2PF2	TACCAGCAATCAGACCCCG	19	63,4	57,9

Таблица 2 – Результаты подбора оптимальной концентрации олигонуклеотидов

Концентрация олигонуклеотидов	Среднее значение порогового цикла	Среднее значение уровня флуоресценции
15 пмоль праймеров и зонда	25,3	0,50
10 пмоль праймеров и зонда	25,7	0,52
10 пмоль праймеров и 5 пмоль зонда	25,4	0,58
5 пмоль праймеров и зонда	24,5	0,51

отмечено для наиболее низкой концентрации олигонуклеотидов – по 5 пмоль.

Таким образом, оптимальной концентрацией олигонуклеотидов была выбрана по 5 пмоль праймеров и зонда, при которой отмечается наибольшая чувствительность реакции.

Для оптимизации температурно-временных циклов ставили ПЦР, варьируя температуру отжига праймеров от 58 до 62°С с шагом в 1 градус. Состав реакционной смеси использовали аналогичный первому опыту.

Оптимизацию проводили путём постановки ПЦР при различных температурах отжига праймеров и длительности отдельных этапов цикла. Концентрацию олигонуклеотидов использовали из результатов подбора оптимальной концентрации (по 5 пмоль праймеров и зонда). Условия отработки и результаты приведены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, уровень флуоресценции практически при всех условиях проведения реакции имеет одинаковые значения (около 0,8), но в случае 60°С наблюдается его более низкий

Таблица 3 – Результаты подбора оптимальных температурно-временных циклов

№ п/п	Условия реакции*	Среднее значение порогового цикла	Среднее значение уровня флуоресценции	Время реакции, мин
1	95°С – 10 сек. 58°С – 15 сек. 67°С – 15 сек	24,8	0,77	78
2	95°С – 10 сек. 59°С – 15 сек. 67°С – 15 сек	21,2	0,83	77
3	95°С – 10 сек. 61°С – 15 сек. 67°С – 15 сек	21,1	0,82	76
4	95°С – 10 сек. 60°С – 15 сек. 67°С – 15 сек	24,5	0,51	76

Примечание: * – реакция включала 40 циклов с 1 циклом предварительной денатурации при 95°С – 2 мин.

Таблица 4 – Оценка чувствительности метода выявления цирковируса свиней

Концентрация ДНК ЦВС-2 в исходном образце № 1, геном эквивалентов (ГЭ)/мкл	Результат реакции	Концентрация ДНК ЦВС-2 в исходном образце № 2, ГЭ/мкл	Результат реакции
$5,6x10^{3}$	Положительно	$7,2x10^{4}$	Положительно
$5,6x10^{2}$	Положительно	$7,2x10^{3}$	Положительно
$5,6x10^{1}$	Положительно	$7,2x10^{2}$	Положительно
$5,6x10^{0}$	Сомнительно	$7,2x10^{1}$	Положительно
$5,6x10^{-1}$	Отрицательно	$7,2x10^{0}$	Сомнительно
$5,6x10^{-2}$	Отрицательно	$7,2x10^{-1}$	Отрицательно
$5,6x10^{-3}$	Отрицательно	$7,2x10^{-2}$	Отрицательно
$5,6x10^{-4}$	Отрицательно	$7,2x10^{-3}$	Отрицательно
x	x	$7,2x10^{-4}$	Отрицательно

показатель, что может быть связано с погрешностями пипетирования. При этом наибольшая чувствительность реакции наблюдается при температурах 59 и 61°С.

Таким образом, выполненный опыт показал, что оптимальными условиями проведения реакции является ПЦР с отжигом при 59 и 61°С.

Чувствительность разработанного метода оценивали путём постановки ПЦР с двумя образцами в десятикратных разведениях (табл. 4). Их исходную концентрацию определяли в количественной ПЦР тест-системе.

Исходя из данных таблицы 4, чувствительность разработанного метода составляет в среднем 6,4 ГЭ/мкл.

Специфичность разработанного метода оценивали путём постановки ПЦР с контрольной панелью образцов ДНК, состоящей из выделенной ДНК из патологического материала, штаммов и изолятов вирусов и бактерий и исследованной с помощью коммерческих тест-систем на наличие генома ЦВС-2. Результаты представлены в таблице 5.

Полученные результаты показали, что разработанный метод обнаружения генома ЦВС-2 обладает высокой специфичностью и позволяет идентифицировать вирус как в чистом виде (штаммы или изоляты), так и в патологическом материале. По своей специфичности метод не уступает коммерческим тест-системам.

Таблица 5 – Выявление генома ЦВС-2 разработанным методом

Наименование образца	Количество образцов	Количество положительных образцов, выявленных собственным методом	Количество положительных образцов, выявленных коммерческими тест-системами
Патологический материал (сыворотка крови, паренхиматозные органы)	53	33	33
Штамм парвовируса	1	0	0
Цирковирус 2 типа	2	2	2
Вирус классической чумы свиней	1	0	0
Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней	1	0	0
Вирус болезни Ауески	1	0	0
Escherichia coli	1	0	0
Salmonella enterica	1	0	0
Streptococcus suis	1	0	0
Streptococcus pneumoniae	1	0	0

Выводы. Проведённые серологические исследования сывороток крови свиней в 2020–2022 гг. показали высокий уровень серопозитивности стад – 79,5%, который обусловлен не только циркуляцией вируса, но и проводимой вакцинацией. При этом частота выявления генома ЦВС-2 составляет 18,9%, что свидетельствует о вирусоносительстве и циркуляции цирковируса в стадах. Для эффективной диагностики цирковирусной инфекции свиней нами разработан ПЦР-метод, который позволяет выявлять геном ЦВС-2 в различном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с чувствительностью 6,4 ГЭ/мкл и специфичностью, не уступающей коммерческим тест-системам.

Список источников

1. Максимович В. В. Инфекционные болезни свиней : монография. 2 изд., перераб. и доп. Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2011. 340 с. ISBN 978-985-512-581-6. EDN VYTLKJ.

2. Возник А., Стадеек Т. Цирковирусы свиней // Инфекционные заболевания – серьезная угроза для свиноводства в Польше: монография / Государственный ветеринарный институт – Государственный научно-исследовательский институт ; под науч. ред. К. Стемпневской, А. П. Лысенко, Д. В. Потапчука, А. П. Лемиша. Пулавы, 2018. С. 150–159.

3. Ouyang T., Zhang X., Liu X., Ren L. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses // Viruses. 2019. Vol. 11, Is. 2. P. 185. DOI 10.3390/v11020185.

4. Palinski R., Piñeyro P., Shang P. [et al.] A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure // Journal of Virology. 2016. Vol. 91, Is. 1. e01879-16. DOI 10.1128/JVI.01879-16.

References

1. Maksimovich V. V. Infekcionnye bolezni svinej : monografiya. 2 izd., pererab. i dop. Vitebsk : Uchrezhdenie obrazovaniya «Vitebskaya ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj mediciny», 2011. 340 s. ISBN 978-985-512-581-6. EDN VYTLKJ.

2. Voznik A., Stadeek T. Cirkovirusy svinej // Infekcionnye zabolevaniya – ser'eznaya ugroza dlya svinovodstva v Pol'she: monografiya / Gosudarstvennyj veterinarnyj institut – Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij institut ; pod nauch. red. K. Stempnevskoj, A. P. Lysenko, D. V. Potapchuka, A.P. Lemisha. Pulavy, 2018. C. 150–159.

3. Ouyang T., Zhang X., Liu X., Ren L. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses // Viruses. 2019. Vol. 11, Is. 2. P. 185. DOI 10.3390/v11020185.

4. Palinski R., Piñeyro P., Shang P. [et al.] A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure // Journal of Virology. 2016. Vol. 91, Is. 1. e01879-16. DOI 10.1128/JVI.01879-16.

Сведения об авторе

Кайсюань Би – магистр ветеринарных наук, аспирант кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Information about the author

Kaixuan Bi – Master of Veterinary Sciences, postgraduate student of the Department of Epizootology and Infectious Diseases, Vitebsk Order of the Badge of Honour State Academy of Veterinary Medicine.