

Научная статья

УДК 619:616.98:578.8:636.4

doi:10.35694/YARCX.2025.72.4.008

## КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕПРОДУКТИВНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ПАРВОВИРУСОМ СВИНЕЙ, РРСС, ЦИРКОВИРУСОМ 2 ТИПА

Кайсюань Би<sup>1</sup>, Павел Петрович Красочко<sup>2</sup>

<sup>1, 2</sup>Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,  
Витебск, Республика Беларусь

<sup>1</sup>bikaixuan1213@163.com

<sup>2</sup>7696695@gmail.com

**Реферат.** В репродуктивной патологии свиней наибольшую роль играют вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), цирковиром 2 типа (ЦВС-2) и парвовирус (ПВС). Для быстрого, высокочувствительного и специфичного обнаружения вирусного генома широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание мультиплексных диагностических систем, которые позволяют одновременно и с высокой эффективностью выявлять несколько возбудителей в одном образце, что значительно сокращает время и стоимость тестирования. Изучение распространения вышеуказанных болезней показало актуальность их для Республики Беларусь. Так, серопозитивность свинок к вирусу РРСС составляет 77,5%. В связи с этим был разработан мультиплексный метод выявления геномов вируса РРСС, ЦВС-2 и ПВС, который позволяет выявлять геномы вышеуказанных вирусов в различном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с чувствительностью, не уступающей моновариантам диагностических реакций.

*Ключевые слова:* полимеразная цепная реакция, распространение, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, парвовирус свиней, серопозитивность, цирковиром свиней

## COMPREHENSIVE DIAGNOSIS OF PORCINE REPRODUCTIVE DISEASES DUE TO PORCINE PARVOVIRUS, PRRS, CIRCOVIRUS TYPE 2

Kaixuan Bi<sup>1</sup>, Pavel P. Krasochko<sup>2</sup>

<sup>1, 2</sup>Vitebsk Order of the Badge of Honour State Academy of Veterinary Medicine,  
Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>1</sup>bikaixuan1213@163.com

<sup>2</sup>7696695@gmail.com

**Abstract.** Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, porcine circovirus type 2 (PCV2), and parvovirus (PVS) play a major role in porcine reproductive pathology. Molecular biological methods, primarily polymerase chain reaction (PCR), have become widespread for rapid, highly sensitive, and specific detection of the viral genome. Modern developments are aimed at creating multiplex diagnostic systems that allow the simultaneously and with high efficiency to identify several pathogens in one sample, which significantly reduces the time and cost of testing. The study of the spread of the above diseases has shown their relevance for the Republic of Belarus. For example, the seropositivity of pig complexes to the PRRS virus is 77.5%. In this regard, a multiplex method for detecting the genomes of the PRRS, PCV2 and PVS viruses has been developed, which allows detecting the genomes of the above-mentioned viruses in various biological materials (blood serum, parenchymatous organs, virus isolates) with a sensitivity that is not inferior to monovariants of diagnostic reactions.

*Keywords:* polymerase chain reaction, spread, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine parvovirus, seropositivity, porcine circovirus

**Введение.** В репродуктивной патологии свиней наибольшую роль играют вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), цирковиром 2 типа (ЦВС-2), вирус гриппа свиней, парвовирус (ПВС) и в меньшей степени – вирус классической чумы свиней и вирус болезни Ауески ввиду обязательной вакцинации и благополучия свинок по данным болезням в Республике Беларусь.

Клинические признаки заболеваний, вызываемых вирусом РРСС, ЦВС-2 и ПВС, часто схожи или маскируются, что делает точную и своевременную диагностику критически важной для принятия мер по контролю и профилактике. Более того, эти вирусы часто встречаются в виде коинфекций, которые могут усиливать тяжесть патологии за счёт взаимного влияния на иммунную систему хозяина, как это на-

блюдается в респираторном комплексе свиней или циркулирует ассоциированных заболеваний. Совместное обнаружение нескольких патогенов представляет собой серьёзную диагностическую задачу, поскольку необходимо определить первичный возбудитель или оценить синергетический эффект коинфекции [1; 2; 3].

Для эффективного мониторинга, контроля и проведения дифференциальной диагностики разработано множество лабораторных методов. Традиционные методы, такие как вирусная изоляция и серологические анализы, включая иммуноферментный анализ, позволяют выявлять вирус или антитела к нему. Однако для быстрого, высокочувствительного и специфического обнаружения вирусного генома, особенно в условиях коинфекций и генетической гетерогенности, широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание мультиплексных диагностических систем, которые позволяют одновременно и с высокой эффективностью выявлять несколько возбудителей в одном образце, что значительно сокращает время и стоимость тестирования [4].

Целью настоящей работы явилась разработка мультиплексного метода выявления нуклеиновых кислот ПВС, ЦВС-2 и вируса РРСС методом ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводились в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных, на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ и лаборатории молекулярной биологии Института ветеринарной медицины Внутреннего Монгольского Аграрного университета (Китайская Народная Республика).

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

Для выявления генома ЦВС-2 и парвовируса использовали собственно разработанные и апробированные методы.

Для выявления генома вируса РРСС использовали олигонуклеотиды, предложенные Международным эпизоотическим бюро, а для генома ЦВС-2 и ПВС – ранее разработанные (табл. 1).

В качестве положительного контроля использовали изолят ЦВС-2 (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»), штамм вируса РРСС «Lelystad» (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского») и штамм ПВС «КМИ-ЭВ-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 подтверждённым наличием нуклеиновых кислот ЦВС-2, парвовируса и вируса РРСС с помощью коммерческих тест-систем, а также гетерогенные штаммы вирусов и бактерий, потенциально инфицирующие свиней: вируса классической чумы свиней (КМИЭВ-V113), вируса 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 циркулирующего свиней 2 типа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (ООО «ВетБиохим», Россия) и «ГенТестЦирковирус» (ООО «ПЦР технологии», Республика Беларусь).

Для выявления генома ПВС использовали коммерческие наборы: «Тест-система для обнаружения ПВС

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов для выявления геномов ЦВС-2, ПВС и вируса РРСС

Наименование вируса	Шифр олигонуклеотида	Последовательность
РРСС	EU-1 F	5'-GCA-CCA-CCT-CAC-CCR-RAC-3'
	EU-2 F	5'-CAG-ATG-CAG-AYT-GTG-TTG-CCT-3'
	EU-1 R	5'-CAG-TTC-CTG-CRC-CYT-GAT-3'
	EU-2 R	5'-TGG-AGD-CCT-GCA-GCA-CTT-TC-3'
	Probe EU-1	5'-(6-HEX)-CCT-CTG-YYT-GCA-ATC-GAT-CCA-GAC-(BHQ1)
	Probe EU-2	5'-(HEX)-ATA-CAT-TCT-GGC-CCC-TGC-CCA-YCA-CGT-BHQ1
ЦВС-2	CVS2F1F2	5'-GGAAGTGTGCCTTTTTTGGC-3'
	CVS2R1R2	5'-AGCTTCTACAGCTGGGACAG-3'
	CVS2PF2	5'-(FAM)-TACCAGCAATCAGACCCCG-(BHQ1)
ПВС	PPVR	5'-AGTGTTCCTTTCCACAAAAGT-3'
	PPVF	5'-GCACCAAACCTAACAGATGATTTTC-3'
	PPVZ	5'-(Cy5)-TGCTGACTCTCCTCAACAACCT-(BHQ1)

Таблица 2 – Результаты выявления генома вируса РРСС

Наименование испытуемого материала	Количество проб, шт.	Результат
Штамм «Lelystad»	1	Положительно
Положительные сыворотки крови	8	8 положительно
Отрицательные сыворотки крови	20	20 отрицательно
Положительный патологический материал	9	9 положительно
Отрицательный патологический материал	19	19 отрицательно

методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (ООО «Ветбиохим», РФ) и «ГенТест Парвовирус» (ООО «ПЦР технологии», РБ).

Для выявления генома вируса РРСС использовали коммерческие наборы: «АртТест РРСС» (ООО «АртБиоТех», РБ) и «Тест-система «РРСС» для выявления и генотипирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), «Набор реагентов «ПЦР-РРСС-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР», РФ).

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

**Результаты исследований.** Проведённые нами ранее исследования по распространённости цирковирусной и парвовирусной инфекций в Республике Беларусь показали актуальность в разработке средств быстрой и эффективной диагностики [5; 6]. В случае же с РРСС проблема стоит ещё более остро.

Анализ проведённых в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней УО ВГАВМ (ранее лаборатории биотехнологии научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ) серологических исследований показал высокий процент положительных проб сывороток крови: из 267 сывороток крови, исследованных в период 2020–2022 гг., 207 были положительны на наличие специфических антител к вирусу РРСС, что составляет 77,5%. Исследования по выявлению генома вируса не были столь обширны, но, как правило, при выявлении положительной

пробы 90–100% проб из этой же группы содержали геном РРСС.

Высокий уровень серопозитивности является следствием вакцинации против данного возбудителя, т. к. в настоящее время в Республике Беларусь лишь единичные свиноккомплексы, как правило, племенные или специализирующиеся на откорме, не проводят вакцинацию. Но несмотря на проводимые профилактические мероприятия, РРСС остаётся актуальной проблемой свиноводства ввиду высокой вариабельности вируса.

Для разработки мультиплексного метода выявления геномов ПВС, ЦВС-2 и вируса РРСС первоначально были протестированы олигонуклеотиды к вирусу РРСС. Для этого провели ПЦР с предложенными в методике условиями:

- состав реакционной смеси: праймеры по 10 пмоль, олигонуклеотидные зонды по 5 пмоль, ArtMix ревертаза (5x) 5 мкл, деионизированная вода до 15 мкл; выделенная РНК 10 мкл;

- условия ПЦР: обратная транскрипция 55°C 10 мин.; денатурация 95°C 2 мин.; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95°C 5 сек., отжига при 60°C 15 сек., элонгации при 67°C 15 сек.; учёт флуоресценции после стадии отжига.

В качестве испытуемых образцов выступали штамм вируса РРСС «Lelystad» и положительные образцы клинического материала с подтверждённым содержанием РНК вируса (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, используемые олигонуклеотиды достоверно позволяют выявить РНК вируса РРСС в сыворотках крови и патологическом материале, инфицированными циркулирующими в Республике Беларусь штаммами вируса РРСС.

Таблица 3 – Значения пороговых циклов при тестировании мультиплексного метода выявления геномов парвовируса, ЦВС-2 и вируса РРСС

Состав смеси нуклеиновых кислот	Среднее значение порогового цикла			
	Мультиплексный вариант (ПВС / ЦВС-2/ вирус РРСС)	Моновариант ПВС	Моновариант ЦВС-2	Моновариант вирус РРСС
ПВС	17,4/-/-	17,6	–	–
ЦВС-2	-/22,6/-	–	22,8	–
РРСС	-/-/23,6	–	–	23,4
ПВС+ЦВС-2	18,8/24,5/-	18,4	24,1	–
ПВС+РРСС	18,7/-/25,5	18,9	–	25,1
ЦВС-2+РРСС	-/24,8/25,9	–	24,6	25,8
ПВС+ЦВС-2+РРСС	19,6/24,9/26,3	19,3	25,0	26,7

Таблица 4 – Выявление геномов ПВС, ЦВС-2 и вируса РРСС разработанным методом

Наименование образца	Количество образцов, шт.	Количество положительных образцов, выявленных собственным методом, шт.			Количество положительных образцов, выявленных коммерческими тест-системами, шт.		
		ПВС	ЦВС-2	Вирус РРСС	ПВС	ЦВС-2	Вирус РРСС
Патологический материал (сыворотка крови, паренхиматозные органы)	152	25	33	17	25	33	17
Штамм парвовируса	1	1	0	0	1	0	0
Цирковирин 2 типа	2	0	2	0	0	2	0
Штамм РРСС	1	0	0	1		0	1
Вирус классической чумы свиней	1	0	0	0	0	0	0
Вирус болезни Ауески	1	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus suis</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0	0	0	0	0

Далее отработанные методы выявления геномов парвовируса, ЦВС-2 и вируса РРСС были объединены в одну реакцию и протестированы со следующими условиями:

– состав реакционной смеси: праймеры и зонд к ЦВС-2 по 5 пмоль, праймеры к ПВС и вирусу РРСС по 10 пмоль, олигонуклеотидные зонды к ПВС и вирусу РРСС по 5 пмоль, ArtMix ревертаза (5x) 5 мкл, деионизированная вода до 15 мкл; выделенные нуклеиновые кислоты 10 мкл;

– условия ПЦР: обратная транскрипция 55°C 10 мин.; денатурация 95°C 2 мин.; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95°C 5 сек., отжига при 60°C 15 сек., элонгации при 67°C 15 сек.; учёт флуоресценции после стадии отжига (канал HEX соответствует вирусу РРСС, FAM – ЦВС-2, Cy5 – парвовирус).

Для оценки чувствительности метода были подготовлены смеси нуклеиновых кислот, содержащих ДНК/РНК выявляемых вирусов, в различных вариантах, и проведены ПЦР в мультиплексном варианте и моновариантах. Результаты представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, чувствительность мультиплексного метода не снижается по сравнению с моновариантами реакций – значения порогового цикла варьируются в пределах одного цикла.

Для определения аналитической специфичности метода были поставлены ПЦР с различным биологическим материалом с использованием разработанного метода (табл. 4).

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

**Выводы.** Проведённые серологические исследования сывороток крови свиней в 2020–2022 гг. показали высокий уровень серопозитивности стад к вирусу РРСС – 77,5%, который обусловлен как циркуляцией вируса, так и проводимой вакцинацией. Для эффективной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней, парвовирусной и цирковиринной инфекций свиней нами разработан ПЦР-метод, который позволяет выявлять геномы вышеуказанных вирусов в различном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с чувствительностью, не уступающей моновариантам диагностических реакций.

#### Список источников

1. Возник А., Стадеек Т. Цирковирин 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. Лемеша. Пулавы, 2018. С. 150–159.
2. 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.
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. WOAH Terrestrial Manual 2021: 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus). URL: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.09.06\\_PRRS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.06_PRRS.pdf) (дата обращения: 05.11.2025).
5. Би К., Борисовец Д. С. Распространение парвовирусной инфекции свиней в Республике Беларусь и ее диагностика методом полимеразной цепной реакции // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2025. № 1. С. 37–42. EDN AACMB.

6. Би К. Распространённость и диагностика цирковиральной инфекции свиней в Республике Беларусь // Вестник АПК Верхневолжья. 2025. № 2 (70). С. 111–116. DOI 10.35694/YARCX.2025.70.2.016. EDN IMJLGB.

#### References

1. 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. С. 150–159.
2. 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.
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. WOAH Terrestrial Manual 2021: 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus). URL: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.09.06\\_PRRS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.06_PRRS.pdf) (дата обращения: 05.11.2025).
5. Bi K., Borisovets D. S. Rasprostranenie parvovirusnoj infekcii svinej v Respublike Belarus' i ee diagnostika metodom polimeraznoj cepnoj reakcii // Epizootologiya, immunobiologiya, farmakologiya i sanitariya. 2025. № 1. С. 37–42. EDN AACMB.
6. Bi K. Rasprostranennost' i diagnostika cirkovirusnoj infekcii svinej v Respublike Belarus' // Vestnik APK Verhnevolzh'ya. 2025. № 2 (70). С. 111–116. DOI 10.35694/YARCX.2025.70.2.016. EDN IMJLGB.

#### Сведения об авторах

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

**Павел Петрович Красочко** – доктор биологических наук, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных, Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», spin-код: 2825-0170.

#### Information about the authors

**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.

**Pavel P. Krasochko** – Doctor of Biological Sciences, Candidate of Veterinary Sciences, Docent, Head of the Branch Laboratory of Veterinary Biotechnology and Infectious Animal Diseases, Vitebsk Order of the Badge of Honour State Academy of Veterinary Medicine, spin-code: 2825-0170.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.