DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-11.72>

**ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНЗООТИЧЕСКОЙ ПНЕВМОНИИ
СВИНЕЙ**

**APPROACHES TO THE DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT OF METHODS
FOR MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF PIGS ENZOOTIC PNEUMONIA**

**Куликова Н.Ю., Гребенникова Т.В., Южаков А.Г., Алипер Т.И., Полякова И.В.,
Исаев Ю.Г., Лахтюхов С.В., Гулюкина И.А.***, научные сотрудники
Kulikova N.Y., Grebennikova T.V., Yuzhakov A.G., Aliper T.I., Polyakova I.V.,
Isaev Y.G., Lakhtyukhov S.V., Gulyukina I.A., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

*E-mail: viev@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В статье представлены подходы к разработке и усовершенствованию методов молекулярно-генетической диагностики энзоотической пневмонии свиней. Проведен филогенетический анализ генотипов *M.hyopneumoniae* с использованием фрагмента генома, кодирующего 16S рибосомную РНК. Результаты анализа показали, что *M.hyopneumoniae*, циркулирующая в Томской области, генетически близка к патогенам, циркулирующим в Канаде и США. *M.hyopneumoniae*, циркулирующая в Белгородской области, генетически близка к патогенам, циркулирующим в США и Бразилии.

ABSTRACT

Improved approaches towards diagnostics of swine enzootic pneumonia are addressed in this study. A phylogenetic analysis of different genotypes of *M.hyopneumoniae* was carried out based on genome fragment coding for 16S RNA. The results demonstrated that *M.hyopneumoniae* isolated in Tomsk Region of Russia was genetically close to the strains circulating in Canada and USA. At the same time, *M.hyopneumoniae* isolated in Belgorod Region of Russia was genetically close to the strains circulating in USA and Brasil.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Энзоотическая пневмония свиней, *Mycoplasma hyopneumoniae*, полимеразная цепная реакция.

KEY WORDS

swine enzootic pneumonia, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Polymerase chain reaction

Энзоотическая (микоплазменная) пневмония свиней (лат. - *Pneumonia enzootica suum*, EPS; грипп поросят, энзоотическая бронхопневмония, вирусная пневмония, микоплазменная пневмония, респираторный микоплазмоз свиней) - инфекционная хроническая энзоотическая болезнь свиней всех возрастов, проявляющаяся ремиттирующей лихорадкой, катаральной бронхопневмонией, сухим кашлем. Болезнь вызывает значительные экономические потери вследствие замедления роста и развития поросят из-за плохой усвояемости корма (зараженные животные расходуют на единицу прироста живой массы на 18-20% кормов больше, чем здоровые). Показатели смертности составляют от 2 до 15%, заболеваемость 38-100% [10].

Этиологическим агентом энзоотической пневмонии свиней является *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*). По морфологическим и ферментативным свойствам возбудитель имеет сходство с некоторыми другими видами микоплазм (микоплазмы являются самыми мелкими клетками, способными размножаться в бесклеточной

питательной среде, и обладают крайне короткими геномами, ограничивающими биосинтетические возможности), однако отличается от них высокой требовательностью к питательным средам и медленной репликацией (до 30 дней). Возбудитель распространен повсеместно, особенно в регионах интенсивного свиноводства, и играет важную роль в развитии респираторного симптомокомплекса свиней (РСКС) — многокомпонентного заболевания, одной из актуальных проблем современного свиноводства. Кроме того, возбудитель открывает «ворота инфекции» для условно-патогенной микрофлоры, а также увеличивает тяжесть и продолжительность респираторных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии (прежде всего таких, как цирковирусные болезни и репродуктивно-респираторный синдром свиней, а также стрептококкоз, гемофилез и пастереллез) [1, 2, 6, 10].

Патогенез *M. hyo* представляет собой сложный процесс: в течение длительного времени в эпителиальном слое дыхательных путей образуются колонии, возникает продолжительная воспалительная реакция, иммуносупрессия, а также играет роль взаимодействие с другими инфекционными агентами вирусного и бактериального происхождения.

Источником инфекции являются больные и переболевшие животные, в организме которых *M. hyo* может сохраняться до 15 месяцев. Возбудитель выделяется с частицами слизи при кашле и чихании, а также с молоком и влагалищным секретом, заражение происходит преимущественно воздушно-капельным путем и при прямом контакте. Содержание зараженных и незараженных животных в одном стаде приводит к раннему и часто повторному заражению. К болезни восприимчивы свиньи всех возрастов, но особенно чувствителен молодняк. Инфицирование поросят происходит свиноматками-носителями во время опороса и при прямом контакте, при этом клинические признаки у поросят-сосунков могут отсутствовать, проявляясь только к 2-3-м месяцам. В этом возрасте происходит отъем поросят и объединение их для доращивания, что в свою очередь может вызывать энзоотические вспышки заболевания. Зараженность стада может сохраняться годами, вызывая значительный экономический ущерб.

Проникнув в легкие аэрогенным путем, микоплазмы в течение первых 2 недель после заражения активно размножаются на слизистой оболочке трахеи, бронхов и бронхиол, вызывая образование очажков серозно-катаральной бронхопневмонии. Затем они постепенно проникают в более глубокие части дыхательных путей и в альвеолы, вызывая воспалительные процессы, препятствующие нормальному дыханию. Вследствие этого, а также угнетения возбудителем иммунной системы, представители условно-патогенной микрофлоры (*P. multocida*, *S. suis*, *H. parasuis*, *A. Pleuropneumoniae* и другие) начинают неконтролируемо размножаться в альвеолах, становясь вторичными патогенами. Такая бронхопневмония, представляющая собой коинфицирование *Mycoplasma hyopneumoniae* и вторичными патогенами, называется энзоотической пневмонией. Патологоанатомически заболевание характеризуется серозно-катаральным воспалением легких с локализацией патологического очага в основном верхушечных и сердечных долях, воспалением плевры и перикарда, увеличением бронхиальных лимфоузлов. Трупы истощены и анемичны.

Штаммы *M. hyo* различаются по генетическим и антигенным свойствам. Геном *M. hyo* впервые был секвенирован в 2004 году для штамма 232 и затем в 2005 году для штаммов J и 7448 [11]. Роль генетического и антигенного разнообразия от штамма к штамму до конца не выяснена ни для вирулентности, ни для возможности перекрестных реакций между изолятами [15]. Заражение одним из низковирулентных изолятов *M. hyo* не обеспечивало защиту при последующем заражении высоковирулентным изолятом [12].

Диагностику заболевания проводят с учетом эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных [6,11,17]. В лаборатории направляют фрагменты пораженных легких, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы, сыворотку крови больных поросят.

Рисунок 1 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании фрагментов генома, кодирующую 16S рибосомную РНК *M. hyorheumoniae*. Желтым цветом выделены исследуемые консенсусные последовательности.

Для установления диагноза используют микроскопическое обнаружение возбудителя в легких (методами прямой и непрямой РИФ, окраски по Гимзе); выделение чистых культур на средах Фриза, Гудвина и других с последующей идентификацией по культурально-морфологическим и биохимическим тестам [5,6]; определение антигенных свойств (РА); выявление специфических антител (микроагглютинация, РСК, латексагглютинация, ИФА) [4,6,13], иммуногистохимические исследования [16,18], постановку биопробы на поросятах 2-2,5-месячного возраста из

хозяйств, благополучных по энзоотической пневмонии свиней. Гибридизация *in situ* позволяет выявлять и определять конкретное расположение ДНК *M. hyo* в фиксированных препаратах легких инфицированных свиней. Возможность только посмертной диагностики и длительность выполнения методики существенно ограничили ее применение [10,11]. Широко применяемый метод оценки распространенности и тяжести пневмонии – измерение коэффициента поражения легких при обследовании приблизительно 30 животных. Системы измерения поражений легких имеют несколько модификаций и разные единицы измерения, но для любой из них характерен один и тот же недостаток: высокая субъективность визуальной оценки и возникающая в связи с этим необходимость дополнительных методов диагностики [6,7].

Рисунок 2 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании фрагментов генома, кодирующую 16S рибосомную РНК *M. hyopneumoniae*, (выделенная область). Желтым цветом выделены исследуемые консенсусные последовательности.

Для выявления непосредственно возбудителя энзоотической пневмонии свиней во всем мире широко используется метод полимеразной цепной реакции. Этот метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью и достоверностью [3,11,14]. Кроме того, ПЦР позволяет обнаружить *M. hyo* на более ранней стадии, чем методы, для применения которых должна произойти сероконверсия. Материалом для исследования методом ПЦР являются образцы сыворотки крови, легочной ткани, трахеобронхиальные, носоглоточные смывы и мазки. С помощью этого метода изучается масштаб распространения *Mycoplasma hyopneumoniae* в свиноводческих хозяйствах России и молекулярно-биологические особенности отечественных изолятов данного патогена [13,14,19].

Геномы различных штаммов *M. hyo* различаются между собой, поэтому, необходимо проводить молекулярное типирование для оценки филогенетического родства и выявления молекулярных особенностей штаммов, циркулирующих в поголовье. Таким образом, проведение исследований молекулярной структуры возбудителя энзоотической пневмонии свиней, помогает получить новые знания о генетическом разнообразии *M. hyo* и разработать новые, более эффективные методы диагностики.

Исследовательская работа выполнена в лабораториях эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней, молекулярной биологии и биохимии, в лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ в 2016-2017гг в рамках исполнения государственного задания по теме №0578-2014-0027.

Были проведены исследования свиноводческих хозяйств Томской, Белгородской, Смоленской, Московской области и Краснодарского края. В результате исследования были получены филогенетические дендрограммы *M. hyopneumoniae*, циркулирующей в различных областях Российской Федерации (рис. 1, рис.2). Результаты анализа показали, что *M. hyopneumoniae*, циркулирующая в Томской области, по фрагменту генома, кодирующему 16S рибосомную РНК, генетически близка к патогенам,

циркулирующим в Канаде и США. *M. hyopneumoniae*, циркулирующая в Белгородской области по фрагменту генома, кодирующему 16S рибосомную РНК, генетически близка к патогенам, циркулирующим в США и Бразилии.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Жбанова Т.В., Дрыгин В.В., Дудникова Н.С. Микоплазмозы свиней. 2005. 75 стр.
2. Орлянкин Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика // Свиноводство. 2010. №3. С. 67 – 69.
3. Artushin S. Development of polymerase chain reaction primes to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* // Molecular and Cellular Probes. 1993. №7. P. 381– 385.
4. Erlandson K. Evaluation of three serum antibody ELISA tests for *Mycoplasma hyopneumoniae* // J. Swine Health and Production. 2005. №13(4). P. 198 – 203.
5. Friis N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey // Nord. Vet. Med. 1975. №27. P. 337 – 339.
6. Maes D., Segales J., Meyns T. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs // Vet. Microbiol. 2008. №126(4). P. 297 – 309.
7. Sibila M., Nofrarias M., Lopez-Soria S. et al.. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs // Vet. Microbiol. 2007. №122. P. 97 – 107.
8. Thacker E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* // Anim. Health Res. Rev. 2004. №(2). P. 317 – 320.
9. Thacker E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* / E.L. Thacker // Anim. Health Res. Rev. - 2004. – N5(2) – P. 317-320.
10. Villarreal I, Maes D, Meyns T, Gebruers F, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F.// Vaccine. 2009 Mar 13;27(12):1875-1879
11. Алексеева С.В. Типирование *dichelobacter nodosus* по гену *fima*/ Алексеева С.В., Сидорчук А.А., Панасюк С.Д., Забережный А.Д., Соколов М.Н., Соколова Н.А.// Ветеринария. 2011. №5. С. 27-29.
12. Алипер Т.И. ПЦР в реальном времени для диагностики туберкулеза // Ветеринарная жизнь. 2006. №7-8. С. 13.
13. Гребенникова Т.В. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза/Гребенникова Т.В., Кальнов С.Л., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А.// Ветеринарная патология. 2004. №1-2. С. 92-93.
14. Егорова И.Ю. Генодиагностика сибирской язвы/ Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Колбасов Д.В., Жигалева О.Н., Цыбанов С.Ж., Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д.// Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2006.№4. С. 26-28.
15. Zaberezhny A.D. Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test/ Zaberezhny A.D., Grebennikova T.V., Aliper T.I., Nepoklonov E.A., Kurinnov V.V., Tsybanov S.G., Vishnyakov I.F., Biketov S.F.// DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift. 1999. T. 106. №9. С. 394-397.
16. Стаффорд В.В. Иммуногистохимическая диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней // Ветеринария. 2017. №2. С. 26-30
17. Стаффорд В.В. Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, экспериментально зараженных вирусом репродуктивно-респираторного синдрома свиней и цирковиром свиней типа 2 // Ветеринария. 2016. №9. С. 24-27
18. Stafford V.V. Application of immunohistochemistry in diagnostics/ Stafford V.V.//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 56. №8. С. 18-21
19. Svtina M.A., Absatirov G.G., Shalmenov M.Sh., Sidorchuk A.A., Gulyukin A.M. Epizootiological characteristics of animal rabies in the West Kazakhstan region // Biology and Medicine. 2015. T. 7. №5. С. BM-152-15.