Молекулярная диагностика энзоотической пневмонии свиней Molecular detection of enzootic pneumonia in pigs

Куликова Н.Ю.

г. Москва

УДК 619:616.995.1

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-7-11

Ключевые слова: энзоотическая пневмония, *Mycoplasma hyorheumoniae*, полимеразная цепная реакция

Key words: enzootic pneumonia, *Mycoplasma hyorheumoniae*, polymerase chain reaction.

Резюме. В результате проведенной экспериментальной работы, разработан метод выявления возбудителя энзоотической пневмонии свиней (*Mycoplasma hyorheumoniae*) на основе помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), специфичной к консервативным участкам генов видоспецифических белков. Исследовались пробы патматериала от животных с клиническими признаками респираторного симптомокомплекса, полученные из различных свиноводческих хозяйств России. Исследовали пробы крови, легочных лимфоузлов, жидкости из грудной полости, фрагменты легких свиней. Проводили анализ нуклеотидной последовательности фрагментов генома выделенных изолятов *Mycoplasma hyorheumoniae*.

Summary. Detection method of *Mycoplasma hyorheumoniae*, causative agent of enzootic pneumonia of swine, was developed based on polymerase chain reaction using the genes of specie-specific proteins. The biologic probes were used from pathologic tissues from animals with clinical respiratory manifestations. These probes were collected from swine farms located at different geographical parts of Russia. Blood samples, lung lymph nodes, internal fluids, fragments of lungs were analyzed. The isolates of *Mycoplasma hyorheumoniae* were partially sequenced.

Введение

Энзоотическая (микоплазменная) пневмония 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 hyorheumoniae* (M. hyo). 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].

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.

Диагностику заболевания проводят с учетом эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных [6, 11]. В лаборатории направляют фрагменты пораженных легких, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы, сыворотку крови больных поросят. 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, 11], постановка 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 [10, 11]. Широко применяемый метод оценки распространенности и тяжести пневмонии – измерение коэффициента поражения легких при обследовании приблизительно 30 животных [6, 7].

Для выявления непосредственно возбудителя энзоотической пневмонии свиней во всем мире широко используется метод полимеразной цепной реакции в различных модификациях, в том числе в реальном времени. Этот метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью и достоверностью и представляет собой комбинацию процедуры амплификации с одновременным проведением детекции, что уменьшает риск контаминации материала и повышает точность определения [3, 11]. В настоящий момент актуальной задачей является разработка и совершенствование отечественных тест-систем на основе различных модификаций ПЦР, как одного из самых современных и эффективных методов диагностики. Также необходимо изучить масштаб распространения *Mycoplasma hyorheumoniae*, и молекулярно-биологические особенности отечественных изолятов данного патогена.

Авторы / Authors

Куликова Н.Ю., Раев С.А., кандидат ветеринарных наук Алексеев К.П., кандидат ветеринарных наук Южаков А.Г., кандидат биологических наук Гребенникова Т.В., доктор биологических наук Аноятбеков М.А., доктор ветеринарных наук Забережный А.Д., доктор биологических наук, профессор Алипер Т.И., доктор биологических наук, профессор Гулюкин А.М., доктор биологических наук Павлова И.Б., доктор ветеринарных наук, профессор Поляков В.Ф., доктор биологических наук, профессор Белоусова Р.В., доктор ветеринарных наук, профессор ФГБНУ ФНЦ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН" (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия.
Kulikova N.YU., Raev S.A., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Anoyatbekov M.A., Zaberezhnyj A.D., Aliper T.I., Gulyukin A.M., Pavlova I.B., Polyakov V.F., Belousova R.V.

Таблица 1. Результаты обнаружения ДНК *M. hyorheumoniae* в полевых образцах

№ п/п	Наименование образца	Результаты обнаружения ДНК <i>M. hyorheumoniae</i> с использованием праймеров MHP102, количество образцов
1	Пробы легких поросят, Тюменская область, 7 образцов	6
2	Пробы жидкости из грудной полости абортированных плодов свиней, 105-108 дней гестации, Тюменская область, 2 образца	-
3	Пробы легких абортированных плодов свиней, 105-108 дней гестации, Тюменская область, 3 образца	-
4	Пробы цельной крови свиней, полученных Московская область, 16 образцов	11
5	Пробы цельной крови свиней, полученных Московская область, 10 образцов	3
6	Пробы сборной жидкости из грудной, брюшной полости и сердечной сумки павших поросят, Смоленская область, 4 образца	1

2 Экспериментальные исследования

2.1. Материалы и методы.

Для первичного мониторинга свиноводческих хозяйств России на наличие *Mycoplasma hyorheumoniae* исследовались 20%-е суспензии проб легких, средостенных лимфоузлов, а также пробы цельной крови и жидкости из грудной полости, полученные от животных разных возрастных групп из свиноводческих хозяйств Томской, Смоленской, Московской и Белгородской областей.

Были использованы собственные олигонуклеотидные праймеры, а также описанные в литературе (Yamaguti M, Muller E.E., Piffer A.I. et al; Brazilian Journal of Microbiology, July 2008, p. 471-476). В результате, для проведения "гнездовой" ПЦР были отобраны праймеры на консервативную область гена 16S рРНК *M. hyo* : M1F5' GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A3'; M1R5' TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC

C 3'; M2F 5'ACT AGA TAG GAA ATG CTC TAG T 3'; M2R 5' GTG GAC TAC CAG GGT ATC T3'. Для проведения ПЦР в один раунд с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле были подобраны праймеры на консервативную область генов видоспецифичных для *M. hyo* белков: поверхностного протеина p97 - MHPcheck225569F 5'-TCC TTG GTG AGT AAA TCC TGG-3', MHPcheck 226021R 5'-AGG CTC AAA AAT TGA TCT CCC T-3'; поверхностного протеина p102 - Mh223404F 5'-AGA CTC GCT TTT GAT GCA ACC -3', Mhcheck223604R 5'- AGG CTT TGG AAA TAC ACA ACA AGC-3', мембранного протеина p46: P46IntFS 5' GCA GCA GGT TGT GGA CAG AC; P46IntRS 5' CAG CAT TTT CGC CTT CAG GAG3'. Для проверки праймеров использовалась ДНК, выделенная из культуры *Mycoplasma hyorheumoniae*, штамм J (НПП "Авивак", Россия). Условия для проведения ПЦР подбирались с использованием прибора "Mastercycler gradient" ("Эппендорф", Германия). Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл на одну пробу. Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 10 ммоль Tris-HCl (pH=9,0), 50 ммоль KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 ммоль MgCl2, 10 пмоль каждого праймера, 0,25 ммоль каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 5 мкл выделенной ДНК. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера при помощи секвенирования ПЦР-продуктов с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Великобритания) согласно инструкции изготовителя. Электрофорез ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0. Copyright © 1997–2004 гг.) и программы SeqMan из пакета программ Lasergene (version 7.1.0.(44) Copyright © 1993–2006 гг.).

Таблица 2. Первичные последовательности фрагментов генома *M. hyorheumoniae* на различных стадиях культивирования

Фрагмент гена, 16S rRNA	
6-й пассаж	GTCACTACTTATTGAAAGCGACGGCAAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGTCTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTTGTTAAGTTTAAAGTTAAATGCTAAAGCTCAACTTTAGTCCGCTTTAGATACTGGCAAAATAGAAATATGAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGGAGTGGTGGAAATACGTAGATATTAGGAAGAACCACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTCATATATTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACATAA
9-10-й пассаж	AGCAAGTACTTATTAGAACGACGGCAAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTTGTTAAGTTTAAAGTTAAATGCTAAAGCTCAACTTTAGTCCGCTTTAGATACTGGCAAAATAGAAATATGAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGGAGTGGTGGAAATACGTAGATATTAGGAAGAACCACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTCATATATTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACATAA
11-13-й пассаж	AGCAAGTACTTATTAGAACGACGGCAAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTTGTTAAGTTTAAAGTTAAATGCTAAAGCTCAACTTTAGTCCGCTTTAGATACTGGCAAAATAGAAATATGAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGGAGTGGTGGAAATACGTAGATATTAGGAAGAACCACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTCATATATTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACATAA
11-й пассаж	AGAATGGCCCCACGCTTTCGTCCTTAGTGTTCATATTCGACCAGTTAGTGCCTTCGCAATGGGAGTTCTTCTTAATCTACGTATTCCACCACTCCACTAGGAATTCGCTAACCTCTTCATAATTCTATTTTGCCAGTATCTAAAGCGGACTAAAGTTGAGCTTTAGCATTTAACTTTAACTTAACAAAAAACCTACGGACGCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGCTTGCAGACCTATGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGATAGTTTGCCTCGCTTTCTAATAAGGTACCGTCAAGACTAGAGCATTTCTCTATCTAGTAGAA
Фрагмент гена, кодирующего белок р36 (L-лактадегидрогеназу)	
6-й пассаж	AATATTTTATTCATGATTGCAACTGATTTGGCAAAATTTTCTTTTCTTTTATCATTTAAGACTAATCTCCTAATAATTTTCTAATTCGGTTTGCTCCTAATAACAACTGGAACTCCGATATTTACTCCGTGAAATCCGATTTCTCTCGTAAATTTGCTCCGGCAATCATAATATTTTGTATCTTTGATAATATTAATAATTTTGGCAATAGCTGCACCAATTCCTAATAAATGTTGCCCTTTTACGATTAATAATTTCTAAGCCCGCGGAGAACTGGATATTTCAAGTTCTTTTCTGTAATTTGAGCTA
9-10-й пассаж	CCATAGACTTTGAACGAATTAGGCGATACCTTTTGCTCTTTTGGCGATTGCAATTTGAAGCCTTGCTGTATCTAAACAGTTCCACTACCGATACTTTTGTATCGGAAAAATCCAGATGCATCCCGTAAAGCCCTTGTAATTATATCAACAGGATTAGCAACCAATACTATTCCACTAAAGCACTTTCTTTGACTTTGTAGTCAATTTCCCGGATAATTCGGATGTTATCAGCTACTAATTCAGCCGAGTTTACCCCGTTTGTGTGCTCTCCGCTGTAATTACAATAAACCAGCATCTTTTAAA
11-й пассаж	TTTGGTCTGGGAAATGGTCGGAAATCTCTCTCTTTATGCAGCAATGAATCAAGGACTTGCATCCGAGTATGGAATTATAGGATATTAATCCTGATTTGCCGATGGTAATGCTTTTGATTTGAAGATGCCTCAGCTCTTTTGCTTTTCCGATTAGTGTCTCCGTTATGAATATAAGATCTAAAGATGCTGATTTTATTGTAATTACAGCGGTAAGACCATTTATTT

Филогенетические деревья были построены при помощи программы MegAlign из пакета программ Lasergene (version 7.1.0.(44) Copyright © 1993–2006 гг.), для определения степени филогенетического родства был использован метод "ближайшего соседа" [Felsenstein, 1989; Vilcek S., et al., 1996].

Результаты исследований

С помощью проведения ПЦР с градиентом температуры отжига праймеров в пределах 55–65 °C были подобраны температурно-временные условия реакции для достижения максимальной эффективности.

Для определения чувствительности метода для разных олигонуклеотидов были использованы 10-кратные разведения ДНК *M. hyo* (штамм J). Для определения специфичности были использованы референтные штаммы *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*. В результате сравнительного анализа были отобраны олигонуклеотиды MHP102, показавшие достаточную чувствительность и специфичность. Длина специфического фрагмента после проведения ПЦР с олигонуклеотидными праймерами MHP102- 201 п.н.

Данная методика были использована для проверки патматериала, полученного от свиней раз-

ных возрастных групп из свиноводческих хозяйств различных областей Российской Федерации. Результаты отображены в Таблице 1.

Положительно реагирующие образцы были использованы в дальнейшей работе по культивированию микоплазм и анализу их генома. В таблице 3 представлены первичные последовательности фрагментов гена, кодирующего 16S rRNA и фрагмента гена, кодирующего белок р36 (L-лактат-дегидрогеназу) *M. hyopneumoniae*.

Сравнение нуклеотидных последовательностей на разных стадиях культивирования хорошо иллюстрирует, что в процессе культивирования в геноме *M. hyopneumoniae* идет быстрое накопление мутаций. Это говорит о том, что при разработке тест-системы на основе ПЦР необходимо создание генно-инженерного контроля, который можно стандартизовать и исключить возникновение случайных мутаций в гене.

Результаты филогенетического 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, генетически близка к патогенам, циркулирующим в США и Бразилии. В результате исследования была создана коллекция положительно реагирующих образцов, использованных для разработки метода диагностики энзоотической пневмонии свиней.

Заключение

В результате проведенных исследований была разработана методика для выявления возбудителя энзоотической пневмонии свиней с помощью ПЦР, создана коллекция положительно реагирующих образцов.

Список литературы

1. Жбанова Т.В., Дрыгин В.В., Дудникова Н.С. Микоплазмозы свиней. 2005. 75 стр.

2. Орлянкин Б.Г., Алипер Т.И., Мишин А.М. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика // Свиноводство. 2010. № 3. С. 67 - 69.
3. Раев С.А., Орлянкин Б.Г., Мишин А.М., Забережный А.Д., Верховский О.А., Гребенникова Т.В., Алексеев К.П., Мусиенко М.И., Стаффорд В.В., Алипер Т.И., Гулюкин М.И. Цирковиральные болезни свиней // Методические рекомендации по диагностике и специфической профилактике / Москва, 2016.
4. Стаффорд В.В., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, экспериментально зараженных вирусом репродуктивно-респираторного синдрома свиней и цирковирусом свиней типа 2 // Ветеринария. 2016. № 9. С. 24-27.
5. Artushin S., Stipkovits L., Minion F.C. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* // Molecular and Cellular Probes. 1993. № 7. P. 381- 385.
6. Erlandson K., Thacker B., Wegner M. et al. Evaluation of three serum antibody ELISA tests for *Mycoplasma hyopneumoniae* // J. Swine Health and Production. 2005. № 13(4). P. 198 - 203.
7. 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.
8. Maes D., Segales J., Meyns T. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs // Vet. Microbiol. 2008. № 126(4). P. 297 - 309.
9. 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.
10. Simionatto S., Marchioro S.B., Maes D. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development // Vet. Microbiology. 2013. № 16. P. 234 - 242.
11. Stafford V.V. Histologic diagnostics of respiratory swine diseases // В книге: AgroSym-2016 Book of abstracts. editor in chief Du?an Kovacevic. 2016. С. 1036.
12. Stafford V.V. Second type of pigs' circovirus infection // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. № 5 (65). С. 306-309.
13. Thacker E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* // Anim. Health Res. Rev. 2004. № (2). P. 317 - 320.
14. Thacker E.L., Minion F.C. *Mycoplasmosis. Diseases of swine*, 10th edition. - Wiley-Blackwell, 2012. P. 779 - 797.
15. Thacker E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* / E.L. Thacker // Anim. Health Res. Rev. - 2004. - N5(2) - P. 317-320.