Масюк Д. М. особливості діагностики ЦВС-2 за використання молекулярних методів дослідження / Д. М. Масюк, А.В. Кокарєв, Г. С. Мовкалова [та ін.] // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2014. – Т. 2, № 2. – С. 56-61. – Режим доступу до журн.: http://biosafety-center.com/2014-%D1%82-2-%E2%84%962/

УДК 619: 636.4:616.9

ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ЦВС-2 ЗА ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Масюк Д. М., *к. вет. наук, доцент*
Кокарєв А. В., *науковий співробітник*
Мовкалова Г. С., *студент*
Коляда С. Г., *науковий співробітник*
Шаталов С. А., *студент*
Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ
e-mail: plppm@ua.fm

У статті наведено особливості діагностики ЦВС-2 типу за допомогою методів ПЛР-РВ та ІФА. Встановлено, що цирковірусна інфекція характеризується віремією з 80 денного віку, яка досягає піку на 110 добу життя. Екскреція ЦВС 2 типу з фекаліями починається з 90 денного віку і триває 40 днів. Найбільша концентрація вірусу відмічається у фекаліях поросят віком 100 та 120 днів. З'ясовано, що сероконверсія специфічних до ЦВС 2 типу антитіл відбувається у двох вікових періодах. Перший починається з 60-ї доби життя і характеризується високим рівнем у крові IgM та продовжується зростанням IgG на 80 добу. Другий період відмічається на 100 день від народження і характеризується зростанням одночасно обох імуноглобулінових фракцій – IgM і IgG, після чого рівень IgM різко зменшується на 110 добу, тоді як IgG продовжує циркулювати у периферичній крові до 130 доби.

Цирковірусна інфекція свиней, ЦВС 2 типу, ПЛР, ІФА, ДНК, імуноглобуліни, IgM, IgG, свині.

Вступ. Цирковірус свиней (ЦВС) – це одноланцюговий кільцевий ДНК вірус родини Circoviridae, який поділяють на два типи: ЦВС 1 типу та ЦВС 2 типу. ЦВС 1 типу не пов'язаний із захворюванням чи клінічними проявами у свиней та вважається непатогенним [1]. Дія ЦВС 2 типу пов'язана з різними клінічними проявами захворювання, включаючи синдром мультисистемного виснаження після відлучення і супроводжується виснаженням, пневмонією, загальною лімфаденопатією, відставанням у рості, враженням шкіри, жовтухою, діареєю тощо [3]. Характерними клінічними та імунологічними ознаками у свиней хворих на цирковірусну інфекцію є зменшення кількості лімфоцитів та приріст моноцитів або макрофагів в лімфоїдних тканинах і периферичній крові, а також порушення цитокінової відповіді, що відбувається постійно або після антигенної стимуляції [4].

Для проведення моніторингу цирковірусної інфекції у сільськогосподарських підприємствах використовують метод ІФА, результати якого свідчать про широке поширення захворювання серед свинопоголів'я країн Європи, Америки та Азії (Darwich та ін., 2004). Діагноз

на цирковірусну інфекцію свиней встановлюють шляхом безпосереднього виявлення його збуднику у біологічному матеріалі. На теперішній час найбільш чутливим , високоспецифічним та більш інформативним є метод ПЛР з детекцією результатів у реальному часі, який дозволяє не лише виявляти збудника інфекційних хвороб, а й розрахувати його кількість у біологічному матеріалі, що в свою чергу дозволяє оцінити рівень ураження органів чи тканин та визначити форму перебігу захворювання. Тому актуальними на теперішній час є своєчасна діагностика цирковірусної інфекції та проведення заходів щодо імунопрофілактики та контролю її якості.

Мета досліджень. Встановити особливості діагностики ЦВС-2 за використання полімеразної ланцюгової реакції, з детекцією результатів у реальному часі (ПЛР-РВ) та імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA).

Матеріал і методи досліджень. Лабораторні дослідження виконані в умовах науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету.

Матеріалом для дослідження слугували зразки сироваток крові і фекалій відібраних від поросят 40, 60, 80, 90, 100, 110, 120, 130 денного віку, по п’ять зразків з кожної групи.

Вміст ДНК збуднику ЦВС 2 типу у зразках біологічного матеріалу визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією результатів у реальному часі.

Наявність специфічних до ЦВС 2 типу антитіл у сироватці крові свиней досліджували методом імуноферментного аналізу пасткового типу. Позитивними за IgM вважалися зразки з оптичною щільністю більше 1,200 Од., за IgG – зразки, що мали значення оптичної щільності вище, ніж 0,900 Од.

Результати досліджень та їх обговорення.

Наведені результати відображають особливості застосування молекулярних методів для діагностики цирковірусної інфекції свиней, які характеризуються виявленням персистенції ДНК вірусу у біологічному матеріалі і визначенням динаміки циркуляції специфічних імуноглобулінів (IgM і IgG) у сироватці крові.

Результати ПЛР дослідження свідчать, що віремія у свиней спостерігається з 80 денного віку і триває 50 діб (рисунок 1). Кількість вірусу у цей час є найменшою і становить 25 г.е./мл. У подальшому вміст ДНК вірусу у крові зростає. Так на 90 добу їх кількість складає 499 г.е./мл, а на 100 добу 455 г.е./мл, що відповідно у 20 та 38 разів більше за початкову їх кількість у крові. Пік віремії реєструється на 110 добу від народження. Вміст у крові ДНК ЦВС 2 типу у цей час дорівнює 4279 г.е. у 1 мл. Після цього, на 120 добу життя концентрація вірусу в крові свиней різко зменшується до 325 г.е./мл і залишається майже не змінним до 130 доби. Таким чином, віремія у свиней починається з 80 денного віку і триває 50 діб, а пік її спостерігається на 110 добу, після чого вміст вірусу у крові різко зменшується, але повністю не зникає і продовжує персистувати у незначній кількості.

Провівши ПЛР-дослідження зразків фекалій встановлено, що екскреція вірусу з фекаліями починається з 90-ї доби життя і продовжується 40 діб. З початку, вміст вірусу у фекаліях становить 3881 г.е./г. Найбільша кількість його виділяється на 100 добу життя – 48865 г.е./г, на 110 день рівень екскретованого вірусу зменшується до 9750 г.е./г та знову збільшується на 120 добу життя – 45378 г.е./г. У 130 денному віці у фекаліях відмічається мінімальна кількість вірусу, яка становить 975 г.е./г.

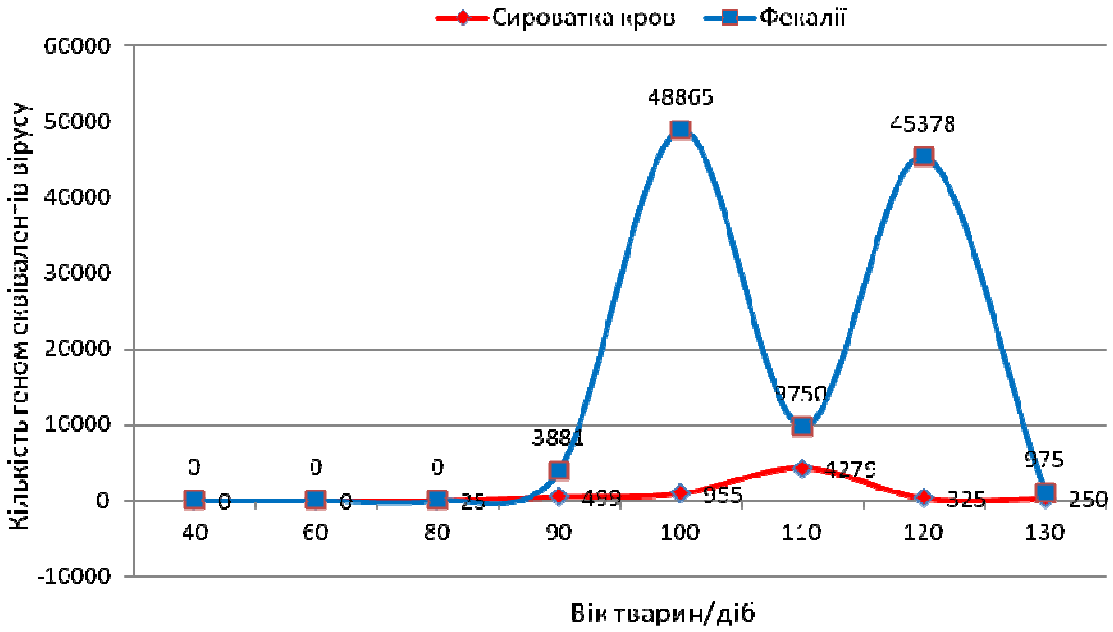

Рисунок 1. Динаміка вмісту геном-еквівалентів цирковірусу у сироватці крові та фекаліях свиней

Отже, накопичення вірусу в сироватці крові хворих тварин найбільш яскраво виражене у свиней на 110 добу, а виділення його з фекаліями на 100 та 120 добу. Це пов'язано з тим, що в господарстві відмічаються ентерити асоційовані з цирковірусною інфекцією. Оскільки при кишковій формі розвитку цирковірозу вірус проявляє тропізм до пейєрових бляшок кишечника, брижових лімфовузлів, тому велика кількість вірусу екскретується з фекаліями.

За результатами імуноферментного аналізу сироваток крові встановлено, що у групі поросят 40 денного віку міститься 40% зразків з низьким позитивним значенням оптичної щільності за IgG, на тлі негативного значення оптичної щільності за IgM (табл. 1). Це свідчить про наявність у цих пробах специфічних антитіл лише класу IgG до збуднику цирковірусу свиней II типу. Виходячи з вищенаведеного можна припустити, що ці імуноглобуліни мають колостральне походження.

Таблиця 1

Динаміка специфічних антитіл проти ЦВС 2 типу у сироватці крові поросят на дорощуванні

Вік тварин, діб	Оптична щільність, Од.		Результат	
	IgM	IgG	IgM	IgG
40	0,251	0,834	–	–
	0,244	0,375	–	–
	0,231	**1,941**	–	+
	0,234	**1,000**	–	+
	0,195	0,348	–	–
60	**2,999**	**0,919**	+	+
	2,999	**1,815**	+	+
	2,999	**2,999**	+	+
	2,999	**0,936**	+	+
	2,999	**2,999**	+	+
80	0,651	**2,999**	–	+
	0,693	**2,999**	–	+
	2,698	**2,953**	+	+
	0,187	**2,999**	–	+
	0,655	**2,999**	–	+

Вікова динаміка специфічних до ЦВС 2 типу імуноглобулінів характеризується тим, що на 60 добу життя у периферичній крові поросят виявляється максимально висока кількість IgM специфічних до ЦВС 2 типу та дещо менше IgG, що свідчить про початкову стадію захворювання цирковірусної інфекції (рис. 2). Наприкінці 11 тижня від народження антитіла класу IgM майже не виявляються у крові поросят, а натомість різко збільшується вміст IgG. Така динаміка імуноглобулінів характеризує кінцеву фазу хвороби, у результаті чого у тварин формується постінфекційний імунітет [5].

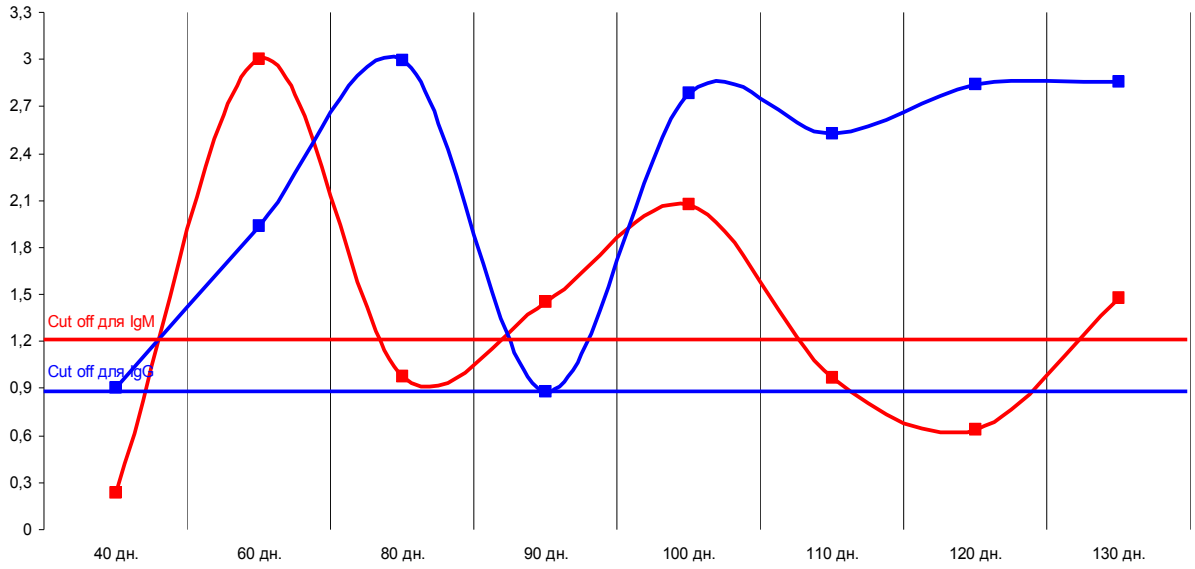

Рисунок 2. Динаміка імуноглобулінів класів M і G специфічних до ЦВС 2 типу у сироватці крові свиней

У поросят 90 денного віку відмічається рецидив інфекції, про що свідчить зменшення у 3,4 рази рівня IgG та збільшення у 1,2 рази кількості IgM (табл. 2). Такі зміни можуть бути обумовлені дією стрес-факторів при переведенні тварин з групи дорощування у групу відгодівлі, та інактивацією

специфічних імуноглобулінів класу G антигенами вірусу, що потрапив до сприйнятливого організму.

Протягом наступних десяти днів рівень імуноглобулінів IgM збільшується у 1,4 рази, а IgG у 3,2 рази. Оскільки клітини пам'яті, які утворюються в результаті перших контактів організму з антигеном, несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу G, а не M, тому вторинна імунна відповідь відразу починається з інтенсивного синтезу цих антитіл, тому можна припустити, що тварини, у зразках яких відбувається різке збільшення рівня IgG, є реінфікованими і мають повторно протікаючу цирковірусну інфекцію.

Таблиця 2

Динаміка специфічних антитіл проти ЦВС 2 типу у сироватці крові свиней на відгодівлі

Вік тварин, діб	Оптична щільність, Од.		Результат	
	IgM	IgG	IgM	IgG
90	**1,308**	0,464	+	–
	0,291	0,126	–	–
	0,238	0,132	–	–
	2,418	**1,282**	+	+
	2,999	**2,399**	+	+
100	**2,999**	**2,989**	+	+
	2,999	**2,198**	+	+
	0,575	**2,831**	–	+
	0,801	**2,999**	–	+
	2,999	**2,914**	+	+
110	0,228	**2,615**	–	+
	0,188	**2,999**	–	+
	0,360	**2,131**	–	+
	2,108	**2,732**	+	+
	1,977	**2,157**	+	+
120	0,414	**2,999**	–	+
	0,455	**2,999**	–	+
	0,763	**2,210**	–	+
	1,007	**2,999**	–	+
	0,530	**2,999**	–	+
130	**2,990**	**2,999**	+	+
	2,999	**2,289**	+	+
	0,410	**2,999**	–	+
	0,723	**2,999**	–	+
	0,360	**2,115**	–	+

У період з 110 по 120 доби життя в зразках крові виявляються лише антитіла класу IgG, рівень яких упродовж 20 діб є майже не змінним, що свідчить про реконвалесценцію та можливе вірусоносійство цих свиней.

Слід зазначити, що на 130 день у крові тварин знову починають з`являтися специфічні до ЦВС 2 типу імуноглобуліни класу IgM на тлі досить високого рівня IgG, що може бути обумовлене новим рецидивом цирковірусної інфекції.

Таким чином, за результатами імуноферментного аналізу встановлено особливості формування та тривалості гуморального імунітету при цирковірусній інфекції свиней за рівнем специфічних імуноглобулінів (IgM і IgG) у сироватці крові.

Висновки.

За допомогою методу ПЛР встановлено, що цирковірусна інфекція характеризується віремією з 80 денного віку, яка досягає піку на 110 добу життя. Екскреція ЦВС 2 типу з фекаліями починається з 90 денного віку і триває 40 днів. Найбільша концентрація вірусу відмічається у фекаліях поросят віком 100 та 120 днів.

З'ясовано, що сероконверсія специфічних до ЦВС 2 типу антитіл відбувається у двох вікових періодах. Перший починається з 60-ї доби життя і характеризується високим рівнем у крові IgM та продовжується зростанням IgG на 80 добу. Другий період відмічається на 100 день від народження і характеризується зростанням одночасно обох імуноглобулінових фракцій – IgM і IgG, після чого рівень IgM різко зменшується на 110 добу, тоді як IgG продовжує циркулювати у периферичній крові до 130 доби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tischer. I. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA / I.Tischer., H. Gelderblom, W. Vettermann, M.A. Koch. // Nature. – 1982. – 295. – P. 64–66.
2. Segalésa J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis / J. Segalésa // Virus Research. – 2012.- P. 10–19.
3. Baró J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: an independent condition or part of the systemic disease? / J. Baró, J. Segalés, J. Martínez. // Vet. Microbiol. – 2014. - № 176. - P. 83-87.
4. Darwich L. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. / L. Darwich, J. Segalés, E: Mateu // Arch Virol. – 2004. – 149. – P. 857-874.
5. Маслянко Р.П. Основи імунобіології. Львів. Вертикаль, 1999.- 472 с.

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ ЦВС-2 ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масюк Д.Н., Кокарев А. В., Мовкалова Г.С., Коляда С. Г., Шаталов С.А.

В статье приведены особенности диагностики ЦВС-2 типа с помощью методов ПЦР-РВ и ИФА. Установлено, что цирковирусная инфекция характеризуется виремией с 80 дневного возраста, которая достигает пика на 110 сутки жизни. Экскреция ЦВС 2 типа с фекалиями начинается с 90 дневного возраста и длится 40 дней. Наибольшая

концентрация вируса отмечается в фекалиях поросят возрастом 100 и 120 дней. Выяснено, что сероконверсия специфических к ЦВС 2 типа антител происходит в двух возрастных периодах. Первый начинается с 60-го дня жизни и характеризуется высоким уровнем в крови IgM и продолжается увеличением IgG на 80 сутки. Второй период отмечается на 100 день от рождения и характеризуется сероконверсией одновременно обеих иммуноглобулиновых фракций - IgM и IgG, после чего уровень IgM резко уменьшается на 110 сутки, тогда как IgG продолжает циркулировать в периферической крови до 130 суток.

Цирковирусная инфекция свиней, ЦВС 2 типа, ПЦР ИФА, ДНК, иммуноглобулины, IgM, IgG, свиньи.

FEATURES OF DIAGNOSTIC PCV-2 USING MOLECULAR RESEARCH METHODS

D. Masiuk, A. Kokarev, H. Movkalova, S. Koliada, S. Shatalov

Dnepropetrovsk State Agrarian and Economic University,
Dnepropetrovsk, Ukraine
E-mail: plppm@ua.fm

There are established peculiarities of diagnostic PCV-2 using methods RT-PCR and ELISA in the article. It was determined that the circovirus infection is characterized by viremia from 80th days of life, which peaked at 110th days of life. Shedding of PCV type 2 with faeces begins from 90th days of life and lasts for 40 days. The highest virus concentration was observed in the faeces from pigs aged 100th and 120th days. It was explored that seroconversion of antibodies specific to PCV type 2 occurs in two age periods. The first stage begins from 60th days of life and it is characterized by high blood levels of IgM and IgG and continues to increase up to 80th days. The second period is marked on the 100th day of life and characterized by simultaneous seroconversion both immunoglobulin fractions - IgM and IgG, afterwards IgM levels sharply decreases to 110th days, whereas IgG continues to circulate in the peripheral blood up to 130th days

Keywords: Porcine circovirus infection, PCV-2, PCR, ELISA, DNA, immunoglobulins, IgM, IgG, pigs