

# РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *EPERYTHROZON SUIS* НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

М.В. Бирюченкова<sup>1</sup>, А.М. Тимина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chelysheva@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: timina@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Разработан метод обнаружения *Eperythrozoon suis*, основанный на ПЦР с электрофоретической детекцией. С использованием разработанного метода в 2004–2013 гг. проведены исследования по выявлению *Eperythrozoon suis*. Возбудитель обнаруживается в пробах цельной крови, отобранных у ремонтных свинок и свиноматок.

Ключевые слова: *Eperythrozoon suis*, ПЦР, эперитрозооз.

## ВВЕДЕНИЕ

Гемотрофные микоплазмы представляют собой особый кластер близкородственных бактерий в пределах рода *Mycoplasma*. Находясь на поверхности эритроцитов, эти бактерии повреждают их мембраны, что приводит к деформации и разрушению эритроцитов, развитию анемии и повреждению эпителия кровеносных сосудов [5, 7].

Среди гемотрофных микоплазм, поражающих животных, важным для изучения является вид *Eperythrozoon suis*, являющийся этиологическим агентом эперитрозооза свиней [3]. К возбудителю восприимчивы свиньи всех возрастов, но особенно предрасположены к заболеванию поросята группы откорма, у которых *Eperythrozoon suis* (*E. suis*) вызывает кратковременное повышение температуры тела, бледность кожных покровов и единичные случаи желтухи [3, 5]. У животных с хроническим течением заболевания клинические признаки сильно варьируют: у поросят-сосунков наблюдаются анемия, желтушность, апатия, отсутствие аппетита, у поросят на откорме отмечается задержка в росте и развитии, у свиноматок снижаются их воспроизводительные качества [3, 4, 5, 7].

Инфекция, вызываемая *E. suis*, широко распространена за рубежом в хозяйствах с интенсивным ведением свиноводства. Мониторинг состояния здоровья животных в Китае показал, что это заболевание встречается

86% свиней [6]. Превалентность инфицированных стад в Японии составляет 7,5% [8]. В Германии 40,3% обследованных стад были положительными в отношении *E. suis* [7]. Возбудитель присутствует более чем в 33% свиных стад Бразилии [2]. Кроме того, заболевание зарегистрировано в Англии, Чехии, Франции, Канаде.

Экономический ущерб от эперитрозооза сводится к потерям от снижения приростов массы тела и развитию вторичных инфекций на фоне иммунодефицита [7].

За рубежом для лабораторной диагностики заболевания используют такие методы, как традиционная ПЦР, ПЦР в реальном времени, ИФА, реакция связывания комплемента, реакция непрямой геммагглютинации. Также с данной целью проводят гистопатологические и гематологические исследования [1, 3, 4, 5, 6].

Данных о распространении эперитрозооза в Российской Федерации до недавнего времени не было, что в определенной степени было обусловлено отсутствием современных отечественных диагностикомов.

Цель данной работы заключалась в разработке метода обнаружения *E. suis* в патологическом материале от свиней и применении этого метода в лабораторной диагностике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Патологический материал.** Для диагностических исследований использовали свежие или замороженные кусочки внутренних органов и цельную кровь от свиней с признаками анемии, лихорадки и желтухи, а также абортинированные плоды и плаценту от свиноматок при репродуктивной патологии.

**Бактерии.** Для проверки аналитической специфичности теста использовали следующие виды бактерий: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharingis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

**Нуклеотидные последовательности.** В работе использовали имеющиеся в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности *E. suis*. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета прикладных программ BioEdit.

**Выделение ДНК** из 10%-ной суспензии образцов патологического материала осуществляли с использованием 6 М гуанидинизотиоцианата и стекловолоконных фильтров GF/F.

**Полимеразная цепная реакция.** Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы, по 5 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до конечного объема 50 мкл. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала 35 циклов при следующем температурном режиме: 30 сек. денатурации при 94°C, 30 сек. отжига праймеров при 55°C и 40 сек. элонгации при 72°C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2,0%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геном *E. suis* содержит как области, общие для разных видов микоплазм, так и видоспецифичные участки. В качестве мишени для ПЦР был выбран ген, отличающийся в пределах вида достаточно высокой консервативностью, но не встречающийся у других видов микоплазм.

Для расчета праймеров был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *E. suis*, имеющихся в базах данных GenBank. На основе результатов сравнительного анализа последовательностей была рассчитана пара праймеров, комплементарных участкам генома, специфичным для данного вида бактерий. Праймеры фланкируют участок размером 180 п.н.

Схема постановки реакции выглядит следующим образом. Из исследуемого образца выделяют суммарную ДНК, используемую впоследствии в реакции амплификации. Продукты ПЦР анализируют в агарозном геле. Наличие фрагмента длиной 180 п.н. свидетельствует о присутствии в пробе *E. suis*.

В ходе оптимизации ПЦР были определены состав реакционной смеси и температурно-временной режим реакции, обеспечивающие максимальную эффективность обнаружения ДНК *E. suis*. Показано, что оптимальными условиями ПЦР являются: количество праймеров — по 5 пМ на реакцию, концентрация MgCl<sub>2</sub> — 3 мМ, отжиг праймеров — при 55°C.

Аналитическая специфичность разработанного метода была проверена на материалах, содержащих различные бактериальные патогены, в том числе микоплазмы: *Eperythrozoon suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharingis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

Для всех проб проводили ПЦР с парой видоспецифичных праймеров. Синтез ампликонов расчетной длины наблюдали только в пробе, содержащей ДНК *E. suis* (рис. 1). В образцах, содержащих другие инфекционные агенты, синтеза каких-либо фрагментов ДНК не наблюдалось, следовательно, исключались перекрестные реакции с гетерологичными видами микоплазм и другими бактериями.



Рис. 1. Результаты проверки аналитической специфичности метода обнаружения ДНК *Eperythrozoon suis*

1, 13 — маркер ДНК;  
2 — проба, содержащая *Eperythrozoon suis*;  
3 — проба, содержащая *Mycoplasma hyopneumoniae*;  
4 — проба, содержащая *Mycoplasma hyorhinis*;  
5 — проба, содержащая *Mycoplasma hyosynoviae*;  
6 — проба, содержащая *Mycoplasma hyopharingis*;  
7 — проба, содержащая *Mycoplasma flocculare*;  
8 — проба, содержащая *Mycoplasma bovis*;  
9 — проба, содержащая *Mycoplasma ovipneumoniae*;  
10 — проба, содержащая *Mannheimia haemolytica*;  
11 — проба, содержащая *Pasteurella multocida*;  
12 — проба, содержащая *Streptococcus suis*.

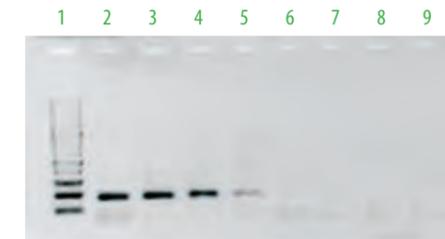


Рис. 2. Результаты проверки аналитической чувствительности метода обнаружения ДНК *Eperythrozoon suis*

1 — маркер ДНК;  
2–8 — 10-кратные разведения ДНК *Eperythrozoon suis* от исходного до 1×10<sup>-6</sup>;  
9 — отрицательный контроль.

Аналитическую чувствительность ПЦР проверяли на серии 10-кратных разведений ДНК *E. suis*. Все пробы исследовались методом ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле. Результаты исследований отражены на рис. 2.

ПЦР позволяла обнаруживать *E. suis* в материале, разведенном в 10<sup>3</sup> раз, что не уступает аналитической чувствительности метода традиционной ПЦР, предложенного ранее [5].

Так как при эперитрозоозе характерно длительное носительство возбудителя в организме переболевших и клинически здоровых животных [7], разработанный метод позволяет эффективно контролировать ситуацию по данному заболеванию, выявляя ДНК *E. suis* даже в случае хронического течения инфекции.

Разработанный метод применялся в диагностических исследованиях с 2004 по 2013 гг. (таблица). С его использованием исследовано 119 проб патологического материала, полученных из 9 свиноводческих хозяйств РФ. *E. suis* был обнаружен в 8 образцах (6,7%).

Все положительные результаты были получены при исследовании проб цельной крови с добавлением антикоагулянта, что показывает необходимость корректного отбора проб для проведения достоверной лабораторной диагностики заболевания. Очевидно, что другие материалы для исследования не подходили.

**Таблица**  
Исследования патологического материала  
из свиноводческих хозяйств РФ на эперитрозооз

Год	Количество хозяйств, предоставивших пробы	Количество исследованных проб/из них положительно
2004	1	3/0
2005	2	2/0
2008	1	2/0
2009	3	4/0
2010	5	61/7
2011	3	33/1
2012	1	2/0
2013	3	12/0



Рис. 3. Результаты исследования проб патологического материала на наличие *Eperythrozoon suis* методом ПЦР  
1, 11 — маркер ДНК;  
2 — отрицательный контроль;  
3 — легкие от ремонтных свинок;  
4 — аборт, плоды,  
5 — плацента;  
6 — кровь от ремонтных свинок;  
7 — легкие от поросят-отъемышей;  
8 — кровь от свиноматок;  
9 — кожа;  
10 — положительный контроль.

Эперитрозооз был диагностирован только в двух хозяйствах (в одном хозяйстве из Республики Башкортостан и в одном хозяйстве из Республики Татарстан): ДНК *E. suis* была выявлена в крови у ремонтных свинок с характерными признаками анемии и абортировавших свиноматок. В образцах крови от новорожденных поросят, поросят-сосунов и поросят группы отъема с типичными признаками острой формы эперитрозооза (бледность кожных покровов, цианоз и некроз ушных раковин) возбудитель обнаружен не был (рис. 3).

Обследуемые хозяйства из Башкирии и Татарстана обнаружили новый для себя вид патологии в 2010 г. Этот период совпал по времени с вводом в ремонтное стадо животных из-за рубежа. У свинок наблюдали массовые проявления анемии и аборты.

В заключение можно сказать, что эперитрозооз — новое для российского свиноводства заболевание, и ситуация с его распространением пока мало изучена. Разработанный метод ПЦР является эффективным средством лабораторной диагностики эперитрозооза.

### Выводы

1. Разработан метод обнаружения *Eperythrozoon suis*, основанный на ПЦР с электрофоретической детекцией.
2. С использованием разработанного метода в 2004–2013 гг. проведены исследования по выявлению *Eperythrozoon suis*. Возбудитель обнаруживается в пробах цельной крови, отобранных у ремонтных свинок и свиноматок.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood / L. E. Hoelzle [et al.] // Vet. Microbiol. — 2003. — Vol. 93. — P. 185–196.
2. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil / A.M. Guimaraes [et al.] // Vet. Rec. — 2007. — Vol. 160, № 2. — P. 50–53.
3. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples / L. E. Hoelzle [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 2007. — Vol. 70. — P. 346–354.
4. Hoelzle L.E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis* // Vet. Microbiol. — 2008. — Vol. 130. — P. 215–226.
5. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma / A. Sokoli [et al.] // Vet. Res. — 2013. — Vol. 44:6 (February). — URL: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/6>.
6. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China / Cong L. Yuan [et al.] // Am. J. Vet. Res. — 2009. — Vol. 70. — P. 890–894.
7. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings / M. Ritzmann [et al.] // Vet. Microbiol. — 2009. — Vol. 133. — P. 84–91.
8. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers / Y. Watanabe [et al.] // J. Vet. Med. Sci. — 2012. — Vol. 74, № 10. — P. 1315–1318.

# DEVELOPMENT OF POLIMERAZE CHAIN REACTION BASED TEST SYSTEM FOR EPERYTHROZON SUIIS DETECTION

M.V. Biryuchenkova<sup>1</sup>, A.M. Timina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chelysheva@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine) FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: timina@arriah.ru

### SUMMARY

A PCR and electrophoresis based tool was developed for *Eperythrozoon suis* detection. During 2004–2013, tests for *Eperythrozoon suis* detection were performed using the developed tool. The agent was detected in whole blood samples collected from replacement gilts and sows.

Key words: *Eperythrozoon suis*, PCR, eperythrozoonosis.

### INTRODUCTION

Hematrophic mycoplasmas are an individual cluster of closely related bacteria within *Mycoplasma* genus. Residing on the surface of red blood cells the bacteria damage cellular membranes thus leading to the RBC deformation and destruction, anemia and damage of blood vessel epithelium [5, 7].

As for hematrophic mycoplasmas affecting animals, study relevant is *Eperythrozoon suis* sp. which is an etiologic agent of porcine eperythrozoonosis [3]. Pigs of all ages are susceptible to the agent but the most disease predisposed are fattening pigs in which *Eperythrozoon suis* (*E. suis*) causes short-term hyperthermia, skin pallor and singular cases of jaundice [3, 5]. Clinical signs are highly variable in animals with chronic disease: weaning pigs demonstrate anemia, jaundice, apathy, anorexia; fattening pigs demonstrate stunting and retardation; reproductive function is decreased in sows [3, 4, 5, 7].

The infection caused by *E. suis* is widely spread abroad on the farms practicing intensive pig farming. Animal health monitoring in China demonstrated that 86% of pigs are affected [6]. Prevalence of infected herds in Japan amounts to 7,5% [8]. In Germany 40,3% of tested herds were *E. suis* positive [7]. The agent is present in over 33% of pig herds in Brazil [2]. In addition, the disease is reported in England, Czech Republic, France and Canada.

Economic damage caused by eperythrozoonosis includes reduction of body weight gain and development of secondary infections due to immune deficiency [7].

Such methods as conventional PCR, real time PCR, ELISA, complement fixation test, indirect hemagglutination test are used abroad for laboratory diagnosis of the disease. Histopathological and hematological examinations [1, 3, 4, 5, 6] are also used.

Until recently there has been lack of data on eperythrozoonosis spread in the Russian Federation and this fact has been to some extent dependent on the lack of up-to-date domestic diagnostics.

The work was aimed at development of a tool for *E. suis* detection in pathological material from pigs and the tool application in the laboratory diagnosis.

### MATERIALS AND METHODS

**Pathological material.** Fresh or frozen pieces of internal organs and whole blood from pigs demonstrating signs of anemia, fever and jaundice as well as aborted fetuses from sows with reproductive pathology were used for diagnostic tests.

**Bacteria.** In order to check the test specificity the following bacteria were used: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma*