

KIAULIŲ PARVOVIROZĖS DIAGNOSTIKA LIZDINĖS POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS METODU

Raimundas Lelešius, Vilimas Sereika, Arūnas Stankevičius

LVA Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys; tel. (8~346) 6 06 91;

el. paštas: lelesiusr@yahoo.de

Santrauka. Darbo tikslas buvo įsisavinti kiaulių parvovirusų (PV) diagnostiką, taikant dviejų mėgintuvėlių lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodą ir įvertinti PV sukeltus reprodukcijos sutrikimus. Kiaulių parvovirozei (KP) diagnozuoti taikyti eritrocitų agliutinacijos slopinimo (EAS) reakcijos bei PGR metodai. Serologinių tyrimų metu ištirtas 281 kraujo serumo mėginys iš 10-ies kiaulininkystės ūkių. Nustatyta, kad suaugusių paršavedžių reprodukcijos sutrikimų tikimybė dėl kiaulių reprodukcinio kvėpavimo sindromo (KRKS) virusų ir PV mišrios infekcijos mažai tikėtina, nes 100,0 proc. jų turėjo aktyvų specifinį imunitetą kiaulių parvovirusams. Didesnė infekcijos tikimybė buvo nevakcinuotoms veislinėms kaulaitėms, iš kurių 2–3 mėn. ir 4–5 mėn. didžioji dalis neturėjo aktyvaus imuniteto, o 6–7 mėn. ir 8–9 mėn. atitinkamai 29,4 proc. ir 5,0 proc.

Lizdinės PGR metodu buvo ištirta 54 atvestų negyvų paršelių plaučių mėginiai (iš 12 stambių kiaulininkystės ūkių) ir 5 mėn. veislinių kaulaičių 6 sujungti kraujo serumo mėginiai. PGR metodu nustatyta 11 teigiamų plaučių mėginių (20,4 proc.) ir 4 sujungti kraujo serumo mėginiai.

Raktažodžiai: kiaulių parvovirozė, polimerazės grandininė reakcija.

DIAGNOSIS OF PORCINE PARVOVIRUS INFECTION BY NESTED POLIMERASE CHAIN REACTION IN LITHUANIA

Raimundas Lelešius, Vilimas Sereika, Arūnas Stankevičius

Veterinary Institute of Lithuania Veterinary Academy, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys, Lithuania.

tel. +370 346 60 691; e-mail: lelesiusr@yahoo.de

Summary. The aim of performed study was to introduce nested polymerase chain reaction (PCR) method for diagnosis of porcine parvovirus (PPV) infection in Lithuania and to evaluate the importance of PPV and mixed infections on reproduction failure in pigs. For diagnosis of PPV infection haemagglutination inhibition (HI) test and polymerase chain reaction (PCR) were used. Altogether 281 serum samples of sows and gilts from 2 to 9 months of age were collected at 10 large pig farms in Lithuania and tested by HI test. It was shown that 100.0% of sows had active immunity to PPV infection. In gilts of 2-3 month and 4-5 month of age 100% of investigated animals had no active immunity and in gilts of 6-7 months and 8-9 months of age only 29.4% and 5.0% had no active immunity, respectively.

Nested PCR method was used to diagnose the PPV infection in 54 stillbirths (out of 12 swine farms) and 60 (6 serum pools) seronegative gilts of 5 months age (out of one swine farm). It was found that 20.4% samples of lungs of stillbirths were PPV DNA positive and at least 4 serum samples out of 60 gilts were PPV infected or virus carriers.

Key words: porcine parvovirus infection, HI, PCR.

Įvadas. Reprodukcijos virusinės ligos yra labai nuostolingos kiaulininkystės ūkiams. Reprodukcijos sutrikimus dažniausiai sukelia KRKS virusai (KRKSV), PV, klasikinio kiaulių maro virusai ir Aujeskio ligos virusai (Lukert, 1999; Mengeling, 1999).

KP ir KRKS Lietuvoje pasireiškia kaip endemijos. Endeminių ligų nustatymas neapsiriboja vien tik serologinių tyrimų rezultatais, jis reikalauja papildomų virusologinių tyrimų metodų (virusų išskyrimo ląstelių kultūrose, virusų antigeno nustatymo), PGR ir kt. (Choi, Chae, 2000; Mengeling, 1999). 1–2 kartus persėjami virusai paprastai ląstelių kultūrose citopatogeninio poveikio nesukelia, todėl tenka atlikti 3–4, o kartais ir 5–6 pasaužus. Virusų išskyrimas ląstelių kultūrose trunka ilgai. Necitopatogeniškiems virusams nustatyti reikia ir papildomų metodų, pvz., netiesioginės imunofluorescencijos, imuno-peroksidazės, PGR ir kt. (Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000). Greitai užkrečiamų ligų diagnostikai būtina įsisavinti molekulinės biologijos metodus, t. y. PGR, ir

šiuo metodu tirti mėginius (pvz., kai PV inaktyvuoti arba tiriamoji medžiaga ląstelėms yra citotoksiška). Šiuo metu plačiau taikoma lizdinė PGR, kuri yra ženkliai jautresnė už paprastą (Belak et al., 1998).

Mokslinėje literatūroje paskelbta nemažai publikacijų apie PGR taikymą PV diagnostikoje (Bolt et al., 1997; Gradil et al., 1994; Soares et al., 1999; Waldvogel et al., 1995). Šio metodo įsisavinimas mokslinei ir rutininei diagnostikai tapo dar svarbesnis, kai atsirado galimybė jį taikyti ne vien reprodukcijos sutrikimų priežastims nustatyti, bet ir paršelių multisisteminio išsekimo (PMI) sindromo etiologijos tyrimams. PMI sindrome pagrindinį etiologinį vaidmenį vaidina antro tipo kiaulių cirkovirusai (KCV2), tačiau svarbūs yra ir PV, ir KRKSV (Choi, Chae, 2000; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000).

Lizdinės PGR taikymas ribotas, nes teigiami rezultatai dažnai būna klaidingi. Kadangi tyrimų metu reikia 2–3 kartus atidaryti ir vėl uždaryti reakcijos mėgintuvėlius, padidėja rizika užteršti tiriamąjį mėginį pašaline PV

DNR. Taikyti PV diagnostikoje vien tik tradicinę PGR jau nebeužtenka, nes PV DNR kiekiai ypač mumifikuotuose vaisiuose yra itin maži. Diagnozuojant būtina taikyti jautresnius molekulinės biologijos metodus, tokius kaip lizdinė PGR, kuri minėtos reakcijos jautrumą padidina 100-1000 kartų (Lelešius et al., 2004).

Darbo tikslas – įsisavinti PV diagnostiką dviejų mėgintuvėlių lizdinės PGR metodu su dviem porom oligonukleotidinių pradmenų iš VP2 baltymą koduojančios srities ir įvertinti kiaulių reprodukcijos sutrikimo sukeltų mišrių infekcijų tikimybę.

Tyrimų metodai. Virusinės infekcijos nustatytos klinikiniais, epizootologiniais, serologiniais ir virusologiniais tyrimais.

Epizootologiniai tyrimai. Tyrimų metu analizuoti kiaulių reprodukcijos sutrikimų klinikiniai simptomai, būdingi KP ir cirkovirozei (KC).

Serologiniai tyrimai. Kraujo serumo mėginiai tirti KP atžvilgiu EAS reakcija (EASR) (Lelešius, Sereika, 1998) ir kaip žmonių eritrocitų agliutinogenas naudoti PV antigeno 4 EAS vienetai. Teigiamas titras – 1:32

Serologinių tyrimų metu ištirta 281 įvairaus amžiaus kiaulių kraujo serumo mėginys, surinktas 10-yje kaulininkystės ūkių. Norint įvertinti PV mišrių infekcijų su kitais patogenais tikimybę, atlikti skirtingo amžiaus kiaulių grupių tyrimai, EASR tirti 2–3 mėn., 4–5 mėn., 6–7 mėn. ir 8–9 mėn. kiaulaičių, taip pat 1–3 metų pagrindinių paršavedžių kraujo serumo mėginiai.

Molekulinės biologijos metodai: lizdinė PGR. Lizdinės PGR metodu PV atžvilgiu buvo ištirti 54 atvestų ne gyvų paršelių plaučių (iš 12 kaulininkystės ūkių), 5 kuilių spermos ir 60 veislinių kiaulaičių (5 mėnesių) kraujo serumo mėginiai. Kiaulaičių kraujo serumo mėginiai buvo ištirti EASR, o PGR tyrimu – 6 sujungti mėginiai.

DNR ekstrakcija. DNR ekstrakcija buvo atliekama fenolo-chloroformo-izoamilo alkoholio ir Genomic metodu (Lelešius et al., 2004).

Pirma (paprastoji) PGR atlikta naudojant 31,5 µl H₂O, 5 µl 10xPGR buferio, 5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP's (10 mM), 1 µl OPPV3 pradmuo (5'-TGCAAGCTTAATGGT CGCCTAGAC-3') (20 pmol), 1 µl OPPV4 pradmuo (5'-TGCTGGTAGTGTTCCTGGGTGTTG-3') (20

pmol), 1 µl tritono (10 proc.) ir 0,5 µl Taq DNR polimerazės (5 U) į kiekvieną mėgintuvėlį (t. y. 47 µl reakcijos mišinio) ir pridėta 3 µl DNR. Ant viršaus užlašinta 1–2 aliejaus lašai. Panaudota programa „parvo1“, po to „parvo2“, kaip aprašyta (Belak, 1998).

Antra (lizdinė) PGR atlikta su 32,5 µl H₂O, 5 µl 10xPGR buferio, 5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP's (10 mM), 1 µl OPPV1 pradmens (5'-GCAGTACCAATTCATCTTCT-3') (20 pmol), 1 µl OPPV2 pradmens (5'-TGGTCTCCTTCTGTGGTAGG-3') (20 pmol), 1 µl tritono (10 proc.), 0,5 µl Taq DNA polimerazės (5 U) ir 2 µl produkto po pirmos PGR. Ant viršaus užlašinta 1–2 aliejaus lašai. Pirmos PGR metu gaunamas 418 nukleotidų porų produktas, o lizdinės – 158 nukleotidų porų produktas.

Tyrimų rezultatai. Tyrimų metu nustatyta, kad KP atžvilgiu 100 proc. (n=134) pagrindinių paršavedžių turi aktyvų imunitetą, todėl reprodukcijos sutrikimai šioje grupėje dėl mišrios infekcijos su KRRSV ar kitais patogenais yra mažai tikėtini (1 lentelė).

Didesnė PV mišrių infekcijų tikimybė yra įvairaus amžiaus veislinių kiaulaičių grupėse. 45,5 proc. (5 iš 11) 2–3 mėnesių kiaulaičių kraujo serumo mėginių buvo neigiami, o 54,5 proc. kiaulaičių specifinių antikūnų titras EASR buvo iki 1:256 (pasyvus kolostrinis imunitetas). Didžioji dalis 4–5 mėn. kiaulaičių mėginių – 92,1 proc. (n=15) buvo neigiami, o 7,9 proc. mėginių specifinių antikūnų titras EASR buvo iki 1:256 (pasyvus kolostrinis imunitetas). Šių amžiaus grupių veislinių kiaulaičių kraujo serumo mėginiai neturėjo didesnių antikūnų titrų nei 1:256. Vadinasi, šios kaulaitės neturėjo aktyvaus poinfekcinio imuniteto. PV su KRKSV ir KCV2 mišrių infekcijų tikimybė tokio amžiaus kiaulių grupėse yra didelė.

23,5 proc. (8 iš 34) 6–7 mėn. veislinių kiaulaičių kraujo serumo mėginiai buvo neigiami, o 5,9 proc. specifinių antikūnų titras EASR buvo iki 1:256 (pasyvus kolostrinis imunitetas), tuo tarpu 70,6 proc. (24 iš 34) veislinių kiaulaičių turėjo aktyvų poinfekcinį imunitetą. Iš ištirtų 8–9 mėn. veislinių kiaulaičių 95,0 proc. (19 iš 20) turėjo aktyvų imunitetą ir tik viena kaulaitė buvo serologiškai neigiamą (5,0 proc.).

1 lentelė. Įvairaus amžiaus kiaulių parvovirozės tyrimai EASR

Kiaulių grupė ir amžius	Mėginių skaičius	Imunitetas kiaulių parvovirozės atžvilgiu			
		Neigiamas, n, %	Teigiamas		
			Pasyvus, n, %	Aktyvus, n, %	
Veislinės kaulaitės	2–3 mėn.	11	5 (45,5)	6 (54,5)	-
	4–5 mėn.	76	70 (92,1)	6 (7,9)	-
	6–7 mėn.	34	8 (23,5)	2 (5,9)	24 (70,6)
	8–9 mėn.	20	1 (5,0)	-	19 (95,0)
Veislinės paršavedės ir kuiliai	1–3 m.	134	-	-	134 (100,0)
Iš viso:		275	84 (30,5)	14 (5,1)	177 (64,4)

n – skaičius

Virusologinio tyrimo metu ištirti keturių gimusių ne gyvų paršelių patologinės medžiagos mėginiai. Ištyrus vieną PV DNR PGR teigiamą ir tris neigiamus iš atvestų

ne gyvų ir mumifikuotų paršelių plaučių mėginių, PK-15 ląstelių kultūroje PV nebuvo išskirti. Norint išskirti virusus reikėtų atlikti visų PV DNR PGR teigiamų mėginių

virusologinį tyrimą.

Išsavinant lizdinę PGR buvo naudotas PV NADL-2 kamienas, kurio EA titras – 320 EAR vienetų 0,25 ml. Atlikus PV NADL-2 DNR ekstrakciją Genomic metodu, vieno mėgintuvėlio lizdinės PGR metodu, pavyko nustatyti 418 bp pirmos PGR DNR produktą, atskiedus PV

NADL-2 100 tūkst. kartų, tuo tarpu 158 bp DNR produktas nustatytas atskiedus 1 mln. kartų.

Taikant dviejų mėgintuvėlių lizdinės PGR metodą iš-tirti 54 atvestų negyvų paršelių plaučių, 5 kuilių spermos ir 60 veislinių kiaulaičių (5 mėnesių) kraujo serumo mėginiai (2 lentelė).

2 lentelė. Tyrimų PGR metodu rezultatai

Ūkio nr.	Tiriamoji medžiaga	Tirta mėginių	Teigiami mėginiai	
			n	%
1.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	6	4	66,7
2.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	5	-	-
3.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	2	-	-
4.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	2	1	50,0
5.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	4	-	-
6.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	3	-	-
7.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	6	3	50,0
8.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	4	1	25,0
9.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	2	-	-
10.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	2	-	-
11.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	12	2	16,7
12.	Atvestų negyvų paršelių plaučiai	6	-	-
<u>Iš viso tiriant atvestų negyvų paršelių plaučius</u>		<u>54</u>	<u>11</u>	<u>20,4</u>
7.	Veislinių kiaulaičių (5 mėnesių) kraujo serumas	6 (60 ¹)	4	66,7
13.	Kuilių sperma	5	-	-
Iš viso:		65 (119)	15	23,1 (12,6)

¹sujungta po 10 kraujo serumo mėginių

Ištyrus patologinę medžiagą PGR metodu 11 mėginių (20,4 proc.) buvo teigiami. Teigiami mėginiai buvo nustatyti 5 iš 12 ūkių (41,7 proc.). Šiuose ūkiuose teigiami mėginiai sudarė nuo 25,0 iki 66,7 proc.

Visi tirti spermos mėginiai (n=5) buvo neigiami, t. y. kuiliai nebuvo viruso nešiotojai.

Ištyrus veislinių kiaulaičių sujungtus kraujo serumo mėginius PGR metodu, 4 mėginiai iš 6 (66,7 proc.) buvo teigiami. Ištyrus šių kiaulaičių kraujo serumo mėginius EASR, serologiškai teigiamų kiaulaičių nerasta. Vadinas, jos jau neturėjo kolostrinio imuniteto, bet neturėjo ir poinfekcinio imuniteto. Remdamiesi epizootologinių, serologinių ir molekulinės biologijos tyrimų rezultatais galime teigti, kad 5 mėnesių veislinių kiaulaičių grupėje galėjo būti PV nešiotojų ar natūraliai apsikrėtusių kiaulaičių (tai labiau tikėtina). Mažiausiai po vieną PV DNR PGR teigiamą kiaulaitę buvo tarp 11–20, 31–40, 41–50 ir 51–60 numeriu lydraštyje pažymėtų kiaulaičių. Žinant KP epidemiologijos ypatumus galima teigti, kad PV plinta šios amžiaus grupės individų tarpe.

Aptarimas ir išvados. Serologinių tyrimų rezultatai parodė, kad KP paplitusi visuose tirtuose ūkiuose. Nustatyta, kad visos suaugusios paršavedės turi aktyvų imunitetą, tokių paršingų kiaulių embrionų ir vaisiaus mišri infekcija mažai tikėtina. Serologiniai tyrimai parodė, kad mišrių KRKSV ir PV yra didžiausia iki 7 mėnesių, o su KCV2 – iki 5 mėnesių kiaulių grupėje. Paprastai tokio amžiaus kiaušės praranda kolostrinį imunitetą ir būna serologiškai neigiamos arba turi likutinius kolostrinius antikūnus. Štai 4–5 mėn. amžiaus 100 proc. veislinių kiaulai-

čių neturėjo aktyvaus imuniteto, o 6–7 mėn. – 29,4 proc.

PK-15 ląstelių kultūroje PV išskirti nepavyko. PGR metodu vienodai sėkmingai aptinkama inaktyvuotų ir neinaktyvuotų virusų DNR. Todėl, siekiant išskirti PV, PGR metodu galima greitai sukaupti PV DNR teigiamą medžiagą ir sumažinti netikslingų virusologinių tyrimų skaičių.

Išvados.

1. Reprodukcijos sutrikimai dėl PV ir KRKSV mišrios infekcijos suaugusioms paršavedėms mažai tikėtini, nes 100,0 proc. jų turėjo aktyvų specifinį imunitetą.

2. Didesnė tikimybė susirgti yra nevakcinuotoms veislinėms kiaušaitėms, iš kurių 2–3 mėn. ir 4–5 mėn. amžiaus grupėje 100 proc. kiaulaičių neturėjo aktyvaus imuniteto, o 6–7 mėn. ir 8–9 mėn. – atitinkamai 29,4 proc. ir 5,0 proc.

3. Lizdinė PGR yra jautrus ir specifinis metodas, taikytinas PV ir mišrių infekcijų diagnostikai. Šiuo metodu galima aptikti tiek inaktyvuotų, tiek neinaktyvuotų PV DNR.

4. PV vaidina svarbų vaidmenį kiaušių reprodukcijos sutrikimų etiologijoje. Ištyrus 54 atvestų negyvų paršelių plaučių mėginius PGR metodu, nustatyta 11 teigiamų mėginių (20,4 proc.).

Literatūra

1. Belak S., Rivera E., Ballagi-Pordany A., Hanzhong W., Widen F., Soos T. Detection of challenge virus in fetal tissues by nested PCR as a test of the potency of a porcine parvovirus vaccine

- // Vet. Res. Communications. 1998. V. 22. P. 139–146.
2. Bolt D. M., Hani H., Muller E., Waldvogel A.S. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection // *J. Comp. Pathol.* 1997. V. 117 (2). P. 107–118.
 3. Choi C. S., Chae C. Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2-infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as shown by In-situ Hybridization // *J. Comp. Path.* 2000. V. 123 (4). P. 302–305.
 4. Gradil C. M., Harding M. J., Lewis K. Use of polymerase chain reaction to detect porcine parvovirus associated with swine embryos // *Am. J. Vet. Res.* 1994. V. 55 (3). P. 344–347.
 5. Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus // *J. Comp. Pathol.* 2000. V. 122 (1). P. 9–24.
 6. Krakowka S., Ellis J. A., Meehan B., Kennedy S., McNeilly F., Allan G. Viral wasting syndrome of swine: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus // *Vet. Pathol.* 2000. V. 37. P. 254–263.
 7. Lelešius R., Sereika V. Kiaulių parvovirusų antigeninių savybių tyrimas reprodukcijos sutrikimų metu. Žemės ūkio mokslai, 1998, N. 3. P. 51–55.
 8. Lelešius R., Stankevičius A., Sereika V. Detection of DNA of PPV by PCR. Proceedings from a symposium at The faculty Veterinary Medicine, 2004, LLU, Jelgava, P. 175–178.
 9. Lukert P. D. Porcine circovirus. Diseases of Swine. 8th edition. Edited by Straw B. E., D’Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. USA. 1999. P. 119–124.
 10. Mengeling W. L. Porcine parvovirus. Diseases of Swine. 8th edition. Edited by Straw B. E., D’Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. USA. 1999. P. 187–200.
 11. Soares R. M., Durigon E. L., Bersano J. G., Richtzenhain L. J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1 // *J. Virol. Methods.* 1999. V. 78 (1–2). P. 191–198.
 12. Waldvogel A. S., Broll S., Roskopf M., Schwyzer M., Pospischil A. Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization // *Vet. Microbiol.* 1995. V. 47 (3–4). P. 377–385.

Gauta 2006 09 07