

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.4.09:57.083.3

PCR – DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE KOD SVINJA KOJU
IZAZIVA *MYCOPLASMA SUIIS**
MOLECULAR DIAGNOSTICS OF SWINE INFECTION CAUSED BY
Mycoplasma suis

A. Potkonjak, B. Lako, Vesna Milićević, B. Savić, V. Ivetić,
Dobrila Jakić-Dimić, O. Stevančević, B. Toholj**

Patogena hemoplazma, nazvana *Mycoplasma suis* (prethodni naziv *Eperythrozoon suis*) je uzročnik eperitrozoonoze svinja ili ikteroanemije svinja. Uzročnik može inficirati i ljude. Oboljenje je veoma rasprostranjeno u svetu. Najčešća je latentna infekcija svinja izazvana *M. suis*. Nakon delovanja faktora stresa, oboljenje se klinički manifestuje. Akutni tok se odlikuje pojavom febrilnog stanja i ikteroanemije. Dijagnoza oboljenja se, uobičajeno, postavlja na osnovu epizootiološke ankete, kliničkog pregleda i mikroskopskog pregleda razmaza krvi svinja obojenog, najčešće, po Gimzi. Razvijene su savremene metode molekularne biologije poput PCR, koje su osetljivije i specifičnije u postavljanju dijagnoze infekcije svinja izazvanih *M. suis*. Primenom PCR testa, ovim ispitivanjem je utvrđeno prisustvo *M. suis* na farmama svinja u Republici Srbiji.

Ključne reči: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, anemija, svinje, PCR dijagnostika

Uvod / Introduction

Mycoplasma suis je uzročnik eperitrozoonoze svinja, imununološki posredovane hemolitičke anemije. Morfološki se karakteriše prisustvom okruglih, ovalnih, štapićastih ili prstenastih formi, prečnika od 0,8 μm do 2,5 μm ili čak i većeg, na površini eritrocita (Li i sar., 2008). Ove bakterije se umnožavaju jedino *in*

* Rad primljen za štampu 07. 10. 2009. godine

** Mr sci. med. vet. Aleksandar Potkonjak, asistent, dr sci med. vet. Branko Lako, redovni profesor, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; Vesna Milićević, dr vet. med., istraživač-pripravnik, mr sci. med. vet. Božidar Savić, dr sci. med. vet. Vojin Ivetić, dr sci. med. vet. Dobrila Jakić-Dimić, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; Ognjen Stevančević, dr vet. med., postdiplomac, dr sci. med. vet. Bojan Toholj, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

vivo, izvođenjem biološkog oglada na splenektomisanim životinjama. Eventualnu mogućnost umnožavanja *M. suis* u uslovima *in vitro* saopštavaju Nonaka i sar. (1996). Veličina genoma *M. suis* iznosi 745 kb, koji do danas nije sekvencioniran (Hoelzle, 2008; Messick i sar., 2000).

Eperitroozoonoza svinja je oboljenje rašireno širom sveta i pojavljuje se u svim starosnim kategorijama svinja (Messick, 2004). Prevalencija infekcije u Nemačkoj, u populaciji tovljenika iznosi 13,9 % i infekcija je prisutna na 40,3 % farmi svinja (Ritzmann i sar., 2009). Prevalencija infekcije svinja izazvane *M. suis* u Brazilu kreće se od 13,3 do 24 % (Guimaraes i sar., 2007). Ovo oboljenje je od velikog ekonomskog značaja za svinjarstvo i morbiditet iznosi 30 %, a mortalitet od 10 do 20 % (Wu i sar., 2006).

Eperitroozoonoza svinja protiče u akutnom ili hroničnom toku (Gwaltney, 1995). U akutnom toku kada je u krvi prisutan veliki broj uzročnika, bolest se klinički ispoljava pojavom hemolitične anemije kod prasadi, a ređe i kod tovljenika i krmača. Hronični tok eperitroozoonoze može proticati potpuno asimptomatski. Kada je ispoljena klinička slika, zapaža se anemija i/ili ikterus kod novorođene prasadi uz slabo napredovanje; zaostajanje u rastu i razvoju tovljenika i poremećaji reprodukcije kod krmača (Hoelzle, 2008).

Laboratorijska dijagnostika infekcije kod svinja izazvane *Mycoplasma suis* se zasniva na mikroskopskom pregledu hemijski obojenog razmaza periferne krvi svinja, s obzirom na to da kultivacija uzročnika u *in vitro* uslovima nije moguća. Navodi se da je mikroskopski pregled hemijski obojenog razmaza krvi svinja, ograničene vrednosti zbog niže osetljivosti i specifičnosti. Danas su razvijene metode molekularne biologije za dijagnostiku ove infekcije svinja, koje su osetljivije i specifičnije. Razvoj novih tehnologija za manipulaciju genomom *M. suis*, između ostalog, otvara mogućnosti za razumevanje važnih bioloških osobina hemotropnih mikoplazmi koje su odgovorne za inficiranje sisara. Kao efikasna molekularna tehnika za identifikaciju hemotropnih mikoplazmi kod životinja navodi se PCR, koja se zasniva na amplifikaciji 16S rRNK gena, *rpoB* gena ili specifičnog fragmenta genoma od 1,8 kb za *M. suis*. Ovi testovi mogu da se koriste i za dijagnostiku latentne infekcije *M. suis* kod svinja, kada životinje ne ispoljavaju kliničke simptome bolesti. Molekularne tehnike za dijagnostiku eperitroozoonoze su unapređene uspostavljanjem LightCycler real-time PCR metode za kvantitativnu detekciju *M. suis*. Visoko konzervirani *msg1* gen, koji kodira površinski lokalizovani protein sličan sa GAPDH, a ima ulogu u adheziji za eritrocite, predstavlja gen izbora za definisanje prajmera koji se koriste za PCR. Prednosti ove metode jesu: smanjen rizik kontaminacije, visoka produktivnost, standardizacija i mogućnost korišćenja različitih bioloških materijala - uzoraka (krv, organi itd.). Novi real-time protokol za identifikaciju *M. suis* je specifičan, senzitivan, reproducibilan i pouzdan. Kvantitativni metodi omogućavaju uspostavljanje i procenu značaja terapijskih i profilaktičkih procedura, kao što su vakcinacija i aplikacija antibiotika. Primenom visoko osetljivih i specifičnih tehnika molekularne biologije, moguće je identifikovati prisustvo *M. suis* kod klinički obolelih ili latentno inficira-

nih svinja, kao i identifikovati vektore i rezervoare ovog uzročnika u prirodi (Hoelzle, 2008).

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Materijal / *Material*

Kao materijal za ovo istraživanje korišćeni su zbirni uzorci pune krvi sa EDTA, koja je prikupljena sterilnom venepunkcijom od svinja sa dve farme u Južnobačkom okrugu (farma A i farma B), sa jedne farme u Severnobačkom okrugu (farma C) i sa jedne farme u Braničevskom okrugu (farma D) u Republici Srbiji. Ukupan broj jedinki uključenih u istraživanje je bio 40 (po 10 jedinki sa svake farme, odnosno 2 zbirna uzorka sa po 5 pojedinačnih uzoraka krvi).

Metode / *Methods*

Ekstrakcija DNK

Za izolaciju DNK korišćen je komercijalni set (*QIAamp DNA Mini kit, Qiagen*) prema uputstvu proizvođača.

Reakcija lančane polimerizacije (PCR)

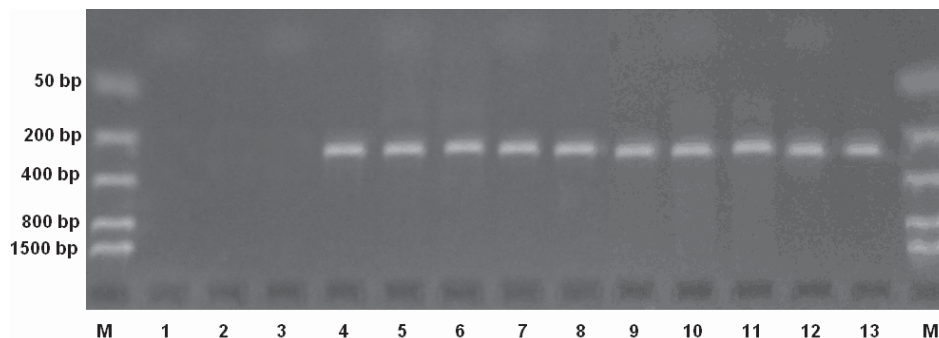
Umnožavanje specifičnog dela genoma *msg1 M. suis* obavljeno je sa sledećim parom prajmera: 5'- AC AACTAATGCACTAGCTCCTATC - 3' forward prajmer za *msg1* i 5' - GCTCCTGTAGTTGTAGGAATAATTGA - 3' reverse prajmer. Reakcija lančane polimerizacije je izvršena upotrebom komercijalnog seta za izvođenje reakcije (*HotStarTaq Master Mix kit, Qiagen*) prema uputstvu proizvođača sa aktivacijom polimeraze na temperaturi od 95°C tokom 15 min., 35 ciklusa (denaturacija na temperaturi od 94°C tokom 0,5 min., anilizacija na temperaturi od 50°C tokom 0,5 min., ekstenzija na 72°C tokom 0,5 min.) i krajnjom ekstenzijom na temperaturi od 72°C tokom 7 min.

Gel elektroforeza

Vizuelizacija reakcije lančane polimerizacije je izvršena gel elektroforezom, u agaroznom gelu koncentracije 2%, u 1 x TAE puferu, sa dodatkom etidium bromida kao fluorescentnog indikatora. Proces elektroforeze je obavljen u *Hoeffer submarine* aparatu za elektroforezu, pri naponu od 60V i jačini struje od 10 mA, tokom 30 minuta. Radi određivanja karakteristične dužine amplifikovanog segmenta korišćen je molekularni marker *Fast Ruler DNA ladder, low range, Fermentas*.

Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Primenom PCR utvrđeno je prisustvo *M. suis* na ispitivanim farmama svinja u Republici Srbiji. U svim zbirnim uzorcima pune krvi svinja identifikovano je prisustvo specifičnog dela genoma *msg1 M. suis* (Fotografija 1).



Fotografija 1. Gel elektroforeza produkata PCR reakcije
Figure 1. Gel electrophoresis of PCR reaction products

Legenda:

M – molekularni marker / molecular marker, 1 – voda / water,
2 i 3 – negativna kontrola / negative control, 4 i 5 – pozitivna kontrola / positive control,
6 do 13 – zbirni uzorci krvi svinja / collective samples of swine blood

PCR – dijagnostika infekcije kod svinja izazvane *M. suis* ima prednost u odnosu na serološku dijagnostiku ove infekcije iz nekoliko razloga. Do danas ne postoji ni jedan komercijalni test za serološku dijagnostiku infekcije svinja izazvane *Mycoplasma suis*, a dosadašnja istraživanja i razvoj seroloških testova bili su bazirani na tri metode: RVK, ELISA i test indirektnih hemaglutinacije. Za ove serološke testove, korišćeni su nedefinisani antigeni *Mycoplasma suis* iz periferne krvi eksperimentalno inficiranih svinja, što predstavlja smetnju za postavljanje tačne dijagnoze. Antigeni dobijeni iz krvi eksperimentalno inficiranih svinja i purifikovani u laboratorijama pokazuju veliku varijabilnost i upravo to predstavlja prepreku za standardizaciju seroloških testova za dijagnostiku infekcije kod svinja izazvane *M. suis*. Osim toga, svi serološki testovi pre određuju titar IgM hladnih aglutinina, nego titar specifičnih antitela klase IgG na *M. suis*. Utvrđivanje titra antitela klase IgM protiv *M. suis* ima ograničenu dijagnostičku vrednost, s obzirom da su vrednosti visine titra varijabilne i zavise od faze infekcije. Sve ovo ukazuje na značaj PCR u dijagnostici infekcije svinja sa *M. suis* (Hoelzle, 2008).

U našem istraživanju, PCR test se pokazao kao jednostavan, brz, specifičan i osetljiv za dijagnostiku infekcije svinja izazvane *M. suis*.

Zaključak / Conclusion

Primenom PCR testa je identifikovano prisustvo *M. suis* na farmama svinja u Republici Srbiji. Neophodna su dalja epizootiološka istraživanja u cilju utvrđivanja prisustva i raširenosti infekcije svinja sa hemotropnim mikoplazmama u Republici Srbiji. Osim toga, istraživanja hemotropnih mikoplazmi su potrebna i zbog: mogućnosti učestvovanja hemoplazmi kao kofaktora u progresiji retrovi-

rusnih, neoplastičnih i imunološki posredovanih oboljenja; nepoznavanja faktora virulencije i patogenetskih mehanizma u razvoju ovih infekcija; kao i potrebe razumevanja funkcije imunološkog sistema, koji je i u ovom slučaju odgovoran za pojavu oportunističnih infekcija.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Ovaj rad je deo projekta "Razvoj i standardizacija imunodijagnostičkih testova (ELISA i WB) za dijagnostiku infekcija životinja i ljudi sa hemotropnim mikoplazmama", broj: 20124, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, 2008-2011.

Literatura / References

1. Guimaraes AM, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *Vet Rec* 2007; 160: 50-3.
2. Gwaltney SM. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: Clinical syndromes and diagnosis. *J Swine Health Prod* 1995; 3: 25-7.
3. Hoelzle LE. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet Microbiol* 2008; 130: 215-26.
4. Li W, Du N, Xu B, Dong W, Qu Z, Wang Y, Sui Y. Alteration of integrin-associated protein (CD47) on experimental porcine eperythrozoonosis. *Vet Res Commun* 2008; 32: 411-8.
5. Messick JB, Smith G, Berent L, Cooper S. Genome size of *Eperythrozoon suis* and hybridization with 16S rRNA gene. *Can J Microbiol* 2000; 46: 1082-6.
6. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 2-13.
7. Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, Bull RW. *In vitro* maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Vet Parasitol* 1996; 61: 181-99.
8. Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet Microbiol* 2009; 133: 84-91.
9. Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. Porcine eperythrozoonosis in China. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: 280-5.

ENGLISH

PCR – DIAGNOSTICS OF SWINE INFECTION CAUSED BY *Mycoplasma suis*

A. Potkonjak, B. Lako, Vesna Milićević, B. Savić, V. Ivetić, Dobriša Jakić-Dimić, O. Stevanović, B. Toholj

The presence of two types of haemoplasm can be established in the swine population. Pathogenic haemoplasm, named *Mycoplasma suis* (previously called *Eperythrozoon suis*) is the cause of swine eperythrozoonosis or swine ichtheroanaemia. The cause of this disease can also infect humans. The disease has spread all over the world. The most frequent form is latent infection of swine caused by *M. suis*. The disease is clini-

cally manifest following action by the stress factor. The acute course of the disease is characterized by the occurrence of a febrile condition and ichtheroanaemia. The disease is usually diagnosed based on an epizootiological poll, a clinical examination, and a microscopic examination of a blood smear stained most often according to Giemsa. Contemporary methods of molecular biology have been developed, such as PCR, which are more sensitive and specific in making a diagnosis of swine infection caused by *M. suis*. In these investigations, the presence of *M. suis* on pig farms in the Republic of Serbia has been determined using the PCR test.

Key words: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, anaemia, swine, diagnostics, PCR

РУССКИЙ

ПЦР – ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ У СВИНЕЙ, ВЫЗЫВАЮЩУЮ *Mycoplasma suis*

**А. Потконяк, Б. Лако, Весна Миличевич, Б. Савич, В. Иветич,
Добрила Якич-Димич, О. Стеванчевич, Б. Тохоль**

В популяции свиней можно утвердить присутствие две гемоплазмы. Патогенная гемоплазма, обозначена как *Mycoplasma suis* (предварительное название *Eperythrozoon suis*) - возбудитель эперитрозооза свиней или иктероанемии свиней. Возбудитель может инфицировать и людей. Заболевание распространено по всему миру. Наиболее частая латентная инфекция свиней, вызванная *M. suis*. После действия факторов стресса, заболевание клинически проявляется. Острое течение отличается явлением фебрильного состояния и иктероанемии. Диагноз заболевания, обычно, поставляется а основе эпизоотологической анкеты, клинического осмотра и микроскопического осмотра мазка крови свиней, окрашенного, чаще всего, по Гимзе. Развита современные методы молекулярной биологии как ПЦР, которые более чувствительные и более специфические в определении диагноза инфекции свиней, вызванных *M. suis*. Применением ПЦР теста, этим испытанием утверждено присутствие *M. suis* на фермах свиней в Республике Сербии.

Ключевые слова: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, анемия, свиньи,
ПЦР диагностика