

УДК 619:616.3:636.4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ *HELICOBACTER SUIS* У СВИНЕЙ

1 Нургалиев Ф.М. – к.в.н., доцент, 2 Поздеев О.К. – д.м.н., профессор, 3 Морозова Л.Г. – к.б.н., доцент, 3 Романова Л.Г.

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», 2 – Казанская государственная медицинская академия – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 3 – ООО «Камский Бекон».

Ключевые слова: *Helicobactersuis*, свиньи, лабораторная диагностика.
Keywords: *Helicobactersuis*, pigs, laboratory identification



РЕФЕРАТ

Язвенные поражения слизистой оболочки желудка у свиней регистрируются независимо от возраста, пола и породы при всех системах промышленного свиноводства. Принято считать, что наиболее частой причиной возникновения язвенной болезни желудка у сви-

ней являются кормовые факторы, связанные с физическими качествами корма, технологический стресс, нарушение обмена веществ, отравления. Язвенной болезнью желудка болеют свиньи разных возрастных групп, независимо от пола и породы, особенно часто болезнь встречается у поросят и подсвинков периода дорощивания и откорма (3-6 месяцев). Этиологические и патогенетические предпосылки язвенной болезни желудка у свиней остаются неясными. Целью настоящей работы являлось изучение распространения хеликобактерий у свиней лабораторными и молекулярно-генетическими методами в свиноводческом комплексе ООО «Камский Бекон» Республики Татарстан, а также изучение возможной связи присутствия бактерий с наличием патологии желудочно-кишечного тракта свиней. Для изучения уровня распространенности и особенности хеликобактерной инфекции в слизистой оболочке желудка свиней нами были использованы макроскопический, микроскопический, культуральный, биохимический и молекулярно-генетические методы исследований. В результате проведенной оценки макроскопических изменений в слизистой желудка свиней установили, что в 62% имеются патологоанатомические изменения характеризующиеся наличием гиперкератоза и эрозий. Лабораторными методами из этих образцов слизистой желудка выделили бактерии рода *Helicobacter*. Молекулярно-генетическим методом исследований выявили ДНК *H. suis*, в отношении генов ДНК *H. pylori* образцы были негативными.

ВВЕДЕНИЕ

В начале восьмидесятых годов XX в. Австралийцам Р. Уоррену и Б. Маршаллу удалось выделить из слизистой оболочки желудка человека спиралевидные бактерии, получивших название *Campylobacter pyloridis*. В 1989 г. микроб выделили в самостоятельный род *Helicobacter*, в соответствии с правилами номенклатуры он был реклассифицирован как *Helicobacter pylori*.

С тех пор *H. pylori* находится в центре внимания гастроэнтерологов и, вероятно, не будет преувеличением назвать эти годы «эрой *H. pylori*». Опубликованные результаты нескольких тысяч исследований позволяют считать доказанной патогенетическую связь *H. pylori* с развитием хронического гастрита, язвенного гастродуоденита, аденокарцином и MALT-лимфом желудка [3].

У млекопитающих и птиц были найдены другие представители рода *Helicobacter*, некоторые из них могут заражать и человека [2, 3, 7]. В ряде научных работ указано, что наиболее распространенным видом хеликобактерий у людей после *H. pylori* является *H. suis*, который также вызывает заболевания ЖКТ у человека [10].

Язвенные поражения слизистой оболочки желудка у свиней регистрируются независимо от возраста, пола и породы при всех системах промышленного свиноводства. Принято считать, что наиболее частой причиной возникновения язвенной болезни желудка у свиней являются кормовые факторы, связанные с физическими качествами корма, технологический стресс, нарушение обмена веществ, отравления [1, 2].

С другой стороны ряд авторов указывает, что воспалительные и язвенные процессы в желудке у свиней (гастриты, эрозии, язвы) связаны с присутствием в желудке хеликобактеров – *H. suis*, *H. pylori* и др. Так, в исследовании D. M. M. Queiroz и др. (1990) электронно-микроскопическими и микробиологическими методами обнаружили в слизистой оболочке желудков свиней убойного воз-

раста ранее не известные спиралевидные бактерии [6].

Позднее E. N. Mendesi и др. (1991) подробно изучили свойства этих микроорганизмов и назвали их *Gastrospirillum suis*, далее эти бактерии были реклассифицированы как *Helicobacter heilmannii* (D. M. M. Queiroz и др., 1995). В связи с наличием ряда внутривидовых различий D. DeGroote (1999) переименовал бактерии в *Candidatus H. suis*. Затем последовал ряд публикаций о распространении этих бактерий среди поголовий свиней в разных странах [4, 5, 8, 9].

Целью настоящей работы являлось изучение распространения хеликобактерий у свиней лабораторными и молекулярно-генетическими методами в свиноводческом комплексе ООО «Камский Бекон» Республики Татарстан, а также изучение возможной связи присутствия бактерий с наличием патологии желудочно-кишечного тракта свиней.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи: провести макроскопическую оценку состояния слизистой оболочки желудков свиней; выделить на питательных средах в условиях лаборатории бактерии рода *Helicobacter*; молекулярно-генетическими методами определить вид выделенных рода *Helicobacter*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При плановом забое свиней в цехе забоя и переработки для изучения патологоанатомических изменений на слизистой оболочке желудков проводили их вскрытие и описание изменений. Состояние слизистой оболочки оценивали по шкале от 0 до 5 по методике предложенной Hessing J. J. C., где 0 соответствует неповрежденной слизистой оболочке; 1 – указывает на умеренный гиперкератоз, охватывающий менее 50% поверхности; 2 – соответствует тяжелому гиперкератозу с охватом более 50% поверхности; 3 – показывает на наличие гиперкератоза и несколько небольших эрозий (менее 5, площадью 2,5 см²); 4 – указывает на гиперкератоз и обширные эрозии (более 5 и / или более 2,5 см²); 5 – соответствует ги-

перкератозу и наличию очень больших эрозий (более 10 эрозий или более 5 см²) и / или язвы.

Для определения степени обсеменения слизистой оболочки желудка свиней хеликобактериями готовили мазки-отпечатки в первые 10 минут после забоя. Так же для этой цели использовали уреазный тест, оценивая скорость изменения окраски раствора.

Выделение бактерий проводили на селективной питательной среде, чашки Петри с посевами помещали в анаэробный стат, создавая микроаэрофильные и капнофильные условия. Культивирование проводили 5 суток при 37 °С, у выросших культур микроорганизмов изучали морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Молекулярно-генетический анализ включал следующие последовательности: отбор биоматериала, выделение ДНК, амплификация ДНК и электрофоретическая детекция продуктов амплификации.

Экстракцию ДНК из биоматериала производили с использованием набора реагентов «ДНК-СОРБЕНТ» производства ООО НПФ «Литех».

Родоспецифичную амплификацию хеликобактерий проводили используя праймеры С97 GCTATGACGGGTATCC и С98 GATTTTACCCCTACACCA. Для амплификации готовили реактив по методике предложенной М. Rocha. Для приготовления реакционной смеси использовали на одну пробу: дистиллированную воду - 12,61 мкл, диоксинуклеозидтрифосфатов - 2 мкл, реакционный буфер - 2 мкл, праймер С97 - 0,57 мкл, праймер С98 - 0,62 мкл и Taq-полимеразу - 0,2 мкл. Общий объем реакционной смеси вместе с исследуемым ДНК образцом составил 20 мкл.

Выявление продуктов амплификации проводили горизонтальным электрофорезом путем их электрофоретического разделения в 2% агарозом геле с добавлением бромистого этидия и флуоресцентной визуализацией в УФ-трансиллюминаторе.

Образцы ДНК, имеющие положительный результат в специфичной ПЦР для

рода *Helicobacter*, подвергли видоспецифической ПЦР с целью детекции двух видов хеликобактеров *H. suis* и *H. pylori*.

Детекция *H. suis*. Определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена 16S рДНК *H. suis* размером 433 п.о. Видоспецифическую ПЦР проводили с применением праймеров V832/TTGGGAGGCTTTGTCTTTCCAn/V1261rGATTAGCTCTGCC TCGCGGCT предложенных Dominic DeGroot и соавт. по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 60 °С – 60 сек, 72 °С – 10 сек в течение 40 циклов.

Детекция *H. pylori*. Определяли фрагменты ДНК *H. pylori* набором реагентов «ХЕЛИКОПОЛ» производства ООО НПФ «Литех» согласно методике предложенной производителем набора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После забоя свиней производили вскрытие желудков, удаляли содержимое и оценивали состояние слизистой оболочки. При визуальном осмотре желудков свиней отмечали наличие или отсутствие пораженных участков слизистой оболочки в фундальной, антральной и пилорической областях желудка. Оценивая состояние слизистой оболочки желудков по J.J.C.Hessing были получены следующие результаты: 0 – 14 (14%); 1 – 24 (24%); 2 – 32 (32%); 3 – 21 (21%); 4 – 9 (9%); 5 – 0 (0%) желудков свиней соотнесены в группы по степени поражений.

Уреазную активность выявляли используя Clo-test. Учет результатов Clo-теста производили через 1 час, 3 часа и 24 часа. Через час наблюдения в 12 пробах наблюдали изменение желтой окраски среды на малиново-красный, через 3 часа в 28 и через 24 часа в 72 пробах был выявлен фермент уреазы.

Для исследований микроскопическим методом в условиях цеха забоя и переработки было изготовлено 60 мазков-отпечатков слизистой пилорического, антрального и фундального отделов желудка от 20 свиней. В мазках-отпечатках на фоне окрашенной слизи обнаружили бледноокрашенные кокковидные, реже изогнутые и спиралевидные грамтрица-

тельные палочки, диаметром от 0,2 до 0,8 мкм и длиной от 2 до 5 мкм. Характерные микроорганизмы этим методом были обнаружены в 11 желудках свиней.

Биоматериал от 20 свиней использовали для выделения хеликобактерий. На селективной питательной среде в 5 чашках Петри к 5 дню выросли мелкие, диаметром 0,5 мм, круглые, выпуклые, прозрачные, влажные колонии. Данный рост колоний характерен для хеликобактерий. В мазках из колоний, при окраске по Граму обнаруживали кокковидные клетки и извитые формы в виде С и S. Кокковидные формы преобладали над другими формами. В препарате «раздавленная капля» были подвижны. Уреазаположительные, каталазоотрицательные.

При ПЦР-исследовании образцов слизистой желудка свиней, отобранных у 20 голов, реакция C97/C98 выявила ДНК бактерий рода *Helicobacter* в 4 случаях (20%).

Положительные в отношении бактерий рода *Helicobacter* образцы ДНК от 4 голов свиней были протестированы с помощью видоспецифических праймеров *H. suis* и *H. pylori*. Во всех 4 случаях образцы были позитивными в отношении гена 16S рДНК *H. suis*. Все образцы в отношении генов ДНК *H. pylori* были негативными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной оценки макроскопических изменений в слизистой желудка свиней установили, что в 62% встречали патологоанатомические изменения характеризующиеся наличием гиперкератоза и эрозий. При постановке уреазного теста через 1 час наблюдения 12% проб были положительными, что говорит о высокой степени обсемененности хеликобактериями данного биоматериала. Всего к концу срока эксперимента в 72% проб был положительный результат.

В мазках-отпечатках характерные микроорганизмы были обнаружены в 55% желудках свиней. Выделить характерные микроорганизмы на селективных питательных средах удалось из 25% проб. Молекулярно-генетическим методом ис-

следований 20 образцов слизистой желудка свиней ДНК бактерий рода *Helicobacter* обнаружили в 20% пробах. Затем эти пробы были протестированы с помощью видоспецифических праймеров *H. suis* и *H. pylori*. Во всех пробах выявили ДНК *H. suis*, ДНК *H. pylori* выявлено не было.

На основании полученных данных можно отметить, что образцы биоматериала в которых была обнаружена ДНК бактерий вида *Helicobacter suis* были получены со слизистой желудка свиней с характерными патологоанатомическими изменениями. Также образцы слизистой, отобранные из этих желудках были «уреазаположительными» и микроскопическим методом в них обнаруживали характерные извитые микроорганизмы. Накопленные данные позволяют сделать первоначальные выводы о возможном участии бактерий рода *Helicobacter* в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта свиней. Но отсутствие достоверных статистических данных об инфицированности хеликобактерами в популяции свиней без клинических признаков заболеваний желудочно-кишечного тракта заставляет с осторожностью относиться к полученным результатам.

Molecular genetic identification of helicobactersuis in pigs. Nurgaliev F.M. – Phd of Vet.Sci., docent; FGBOU VPO “Kazan State Academy of Veterinary Medicine of Bauman” Pozdeev O.K. – Doctor of Medicine Sciences, professor; Morozova L.G. – Phd of Biology sciences, docent FGBOU “Kazan State Medicine academy”; Romanova L.G. OOO “Kazan Becon”
ABSTRACT

Ulcerative lesions of the gastric mucosa in pigs are recorded regardless of age, gender and breed in all industrial pig breeding systems. It is believed that the most common cause of peptic ulcer in pigs is feed factors associated with the physical qualities of the feed, technological stress, metabolic disorders, and poisoning. Peptic ulcer is a disease of the stomach of pigs of different age groups, of different sex and breed, it is widely spread among piglets, especially during the growing and fattening period (3-6

months). Etiological and pathogenetic factors for stomach ulcer in pigs remain unclear. The aim of this work was to study the spread of *Helicobacter pylori* in pigs by laboratory and molecular genetic methods in the pig breeding complex of Kamsky Bacon LLC of the Republic of Tatarstan, as well as to study the possible relationship between the presence of bacteria and the presence of pathology of the gastrointestinal tract of pigs. We used macroscopic, microscopic, cultural, biochemical and molecular genetic methods to study the prevalence and special features of *Helicobacter* infection in the stomach mucosa of pigs. As a result of the assessment of the macroscopic changes in the stomach mucosa of pigs it was found that there are patho-anatomical changes in 62% of the studied cases, characterized by the presence of hyperkeratosis and erosions. Bacteria of the genus *Helicobacter* spp., was isolated from the stomach mucosa samples by laboratory methods. Molecular-genetic method of revealed *H. suis* DNA, and the samples were negative for *H. pylori* DNA genes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабкина, Т.Н. Язвенная болезнь в историческом аспекте / Т.Н. Бабкина, А.В. Козлова // Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике и лечению профилактики болезней животных : материалы международной научно-практической конференции. – ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет». – пос. Персиановский, 2018. – С. 6-11
2. Дерезина, Т.Н. Этиопатогенетические аспекты язвенной болезни желудка у свиней в условиях ООО «РС Развильное» Песчанокопского района Ростовской области / Т.Н. Дерезина, Т.М. Ушакова // Вестник Донского государственного аграрного университета №1 (23.1) – 2017. – С. 11-16
3. Иванов, А.В. Хеликобактеры животных и их значение в патологии человека / А.В. Иванов, О.К. Поздеев, Ю.В. Валеева // Ветеринарный врач №6. – 2010. – С. 17-21
4. Baele, et al. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008), 58, 1350–1358
5. Buck, et al. Ultrastructural and molecular characterization of non-*Helicobacter pylori* species in the gastric mucosa of naturally infected pigs // Braz J Vet Pathol, 2018, 11 (2), 42 – 49
6. Queiroz, et al. A spiral microorganism in the stomach of pigs // Veterinary Microbiology, 24 (1990) 199-204
7. Hessing, et al. Changes in the mucous membrane of the pars oesophageal part of the stomach – prevalence and relations to stress // Tijdschr. Diergeneeskd. 1992.117, 445–450
8. Jong-Hwan Park, et al. The high prevalence of *Helicobacter* sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics // Veterinary Microbiology 104 (2004) 219–225
9. Maira, et al. Bipolar lophotrichous *Helicobacter suis* combine extended and wrapped flagella bundles to exhibit multiple modes of motility // Scientific Repo RTS, 2018, 8:14415, 1-15
10. Padra, et al. *Helicobacter suis* binding to carbohydrates on human and porcine gastric mucins and glycolipids occurs via two modes // VIRULENCE 2018, VOL. 9, NO. 1, 898–918