



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:577.215.3 DOI: 10.17238/issn2072-2419.2019.3.11

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ

Абгарян С.Р. – ст. науч. сотрудник, Никитина Н.В. – к. б. наук, и.о.зав. отделом вирусологии, Семина А.Н. – к.в.н., вед. науч. сотрудник. «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (ВНИВИП).

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, вирус ИБК, ПЦР. **Key words:** avian metapneumovirus, virus IBK, PCR.



РЕФЕРАТ

Респираторные болезни птиц причиняют значительный экономический ущерб птицеводству. В этиологии этих болезней значительная роль принадлежит метапневмовирусной инфекции птиц и инфекционному бронхиту кур. Данные болезни очень часто протекают в ассоциации друг с другом, с другими вирусными и бактериальными инфекциями. Выделение данных вирусов из исследуемого материала с применением известных методов представляет собой достаточно трудно затратный и длительный по времени процесс. Сложность при выделении обусловлены весьма непродолжительным этапом накапливания вирусов в значительных титрах в органах птиц. Поэтому, в последнее время, основная роль в постановке правильного диагноза при данных заболеваниях принадлежит молекулярно-биологическим методам, в частности, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенированию. Основной задачей исследований являлась разработка универсальных праймеров, которые позволяют идентифицировать возбудителей МПВИ птиц и ИБК кур и провести серотипирование данных вирусов методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на ПЦР. В результате исследований было установлено, что наличие в продуктах ПЦР фрагмента кДНК длиной 291 п.н. свидетельствует о присутствии в исследуемом материале РНК МПВ подтипа В, а фрагмента кДНК длиной 501 п.н. для РНК МПВ подтипа А. Наличие в пробе генома вируса ИБК подтверждается выявлением фрагмента длиной 526 п.н. Получение последовательности праймеров показали высокую специфичность в отношении диагностируемых возбудителей, что позволяет успешно использовать их в научно-исследовательских учреждениях, проводящих работу по изучению данных вирусов и молекулярной диагностике соответствующих инфекций.

ВВЕДЕНИЕ

Респираторные болезни птиц, при которых посредством воздушно-капельной передачи происходит быстрое распространение инфекции на значительное поголовье птицы, причиняют значительный экономический ущерб птицеводству. В

этиологии этих болезней значительная роль принадлежит метапневмовирусной инфекции (МПВИ) птиц и инфекционному бронхиту кур (ИБК), вызываемый вариантными штаммами вируса ИБК [2, 3].

Многообразие серотипов возбудителей и вирулентных свойств вирусов, за-

трудняют правильную своевременную постановку диагноза [2, 5].

Причем данные инфекции очень часто протекают в ассоциации друг с другом, с другими вирусными инфекциями и всегда их течение осложняется возникновением секундарных (вторичных) бактериальных инфекций, таких как колибактериоз, респираторный микоплазмоз, орнитобактериоз [1, 3].

Поскольку клинические признаки и патологоанатомические изменения при МПВИ птиц и ИБК не позволяют поставить точный диагноз из-за схожести признаков с другими вирусными и бактериальными болезнями, поэтому основная роль в постановке диагноза принадлежит лабораторным методам, в основном, молекулярно-биологическими [4].

Целью настоящей работы явилось разработка метода идентификации и серотипирования метапневмовируса птиц и вируса инфекционного бронхита кур, основанного на ПЦР методом электрофоретической детекции и секвенирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоматериал. Патологические (трахеи, легкие) для выделения метапневмовируса

(МПВ) птиц брали от клинически больных или павших цыплят 10-30-суточного возраста с признаками респираторных болезней.

Вирус. В работе использовали вакцинный штамм VC-03 подтипа В метапневмовируса птиц, Nemovak Rhone Merilux (Франция); вакцинный штамм 8544 подтипа А метапневмовируса, Nobilis (Голландия); вакцинный штамм вируса инфекционного бронхита кур, Nobilis IB 4/91 (Нидерланды).

Выделение РНК из биоматериала проводили при помощи коммерческого набора «Рибо-сорб» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью набора Реверта -L (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

ПЦР проводили с использованием праймеров, представленных в таблице 1.

Реакционная смесь при постановке ПЦР, объемом 25 мкл, была следующего состава: 5,0 мкл ПЦР-смеси ScreenMix, содержащая Taq ДНК-полимеразу; смесь нуклеотидтрифосфатов, с концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида; 2,0 мМ Mg²⁺; красный и желтый красители; по 1,0 мкл прямого и обратного праймера; 9,9 мкл деионизирован-

Таблица 1

Последовательности праймеров для выявления метапневмовируса птиц и вируса инфекционного бронхита кур

Ген	Праймеры	Последовательность праймеров	Позиция в референтной последовательности	Референтная последовательность	Размер ампликона п.н.
МПВ подтипа А					
Ген G	APVA F APVA R	F-CCGGGACAAGTATCTCTATGG R-CCACACTTGAAAGATCTACCC	1-19 502-482	MF093139.1	501
МПВ подтипа В					
Ген G	APVB F APVB R	F-GGCTTGACGCTCACTAGCAC R-GAGCCAATAAGCCCAACAA	6125-6144 6416-6397	AB548428.1	291
ИБК					
Ген S1	IBK F IBK R	F-TAAGMGYGATGGCTCTCGTAT R-TAAAGGCGCCACAACTGTTC	21587-21608 22113-22093	MK032177.1	526

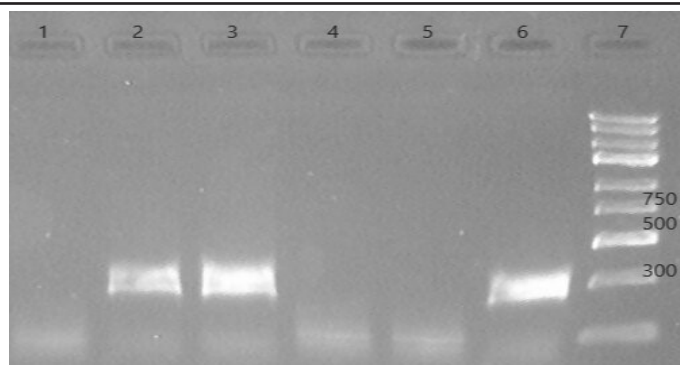


Рис. 1. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа В в вирусосодержащем материале. 1- отрицательный контроль выделения; 2,3 - положительные пробы; 4,5 -отрицательные пробы; 6 - вакцинный штамм VC-03 МПВ птиц; 7 - маркер молекулярной массы.

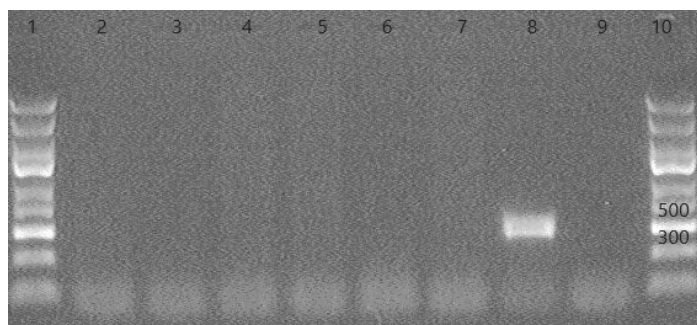


Рис. 2. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома метапневмовируса подтипа А в вирусосодержащем материале. 9 - отрицательный контроль выделения; 2-7 - отрицательные пробы; 8 - вакцинный штамм 8544 МПВ птиц; 1,10 - маркер молекулярной массы.

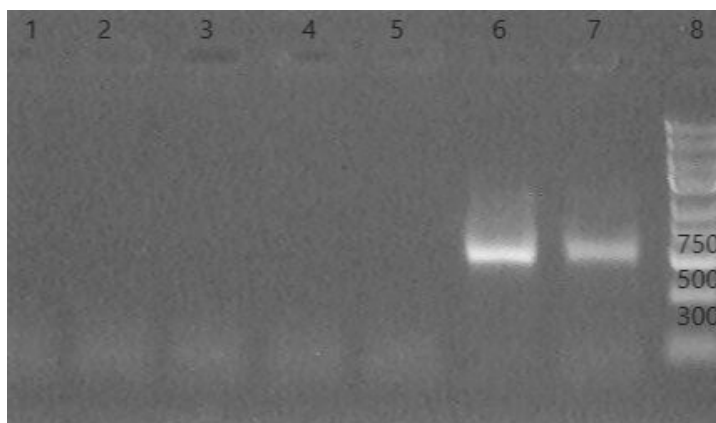


Рис. 3. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома вируса ИБК в вирусосодержащем материале. 1 - отрицательный контроль выделения; 2-5 - отрицательные пробы; 6 -положительная проба; 7 - вакцинный штамм IB 4/91 вируса ИБК; 8 - маркер молекулярной массы.

ной воды. Использовали следующие температурные режимы: начальная денатурация 95 оС-5 мин-1цикл; 35 циклов: 95оС-10 сек, 55 оС-20 сек, 72 оС-10 сек.

ПЦР и ОТ-ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Анализ фрагментов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,7% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 269 нм.

Для определения размера фрагмента кДНК использовали маркер молекулярного веса длиной от 100-1500 п.н.

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов G МПВ и гена S1 вируса ИБК проводили с использованием праймеров (табл.1) и набора «DYEnamic ET terminator kit». Продукты реакции секвенирования анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвинаторе MegaBase.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для детекции генов G МПВ подтипов А и В и гена S1 вируса ИБК подбирали праймеры в программе VectorNTI с использованием последовательностей генов, депонированных в международной базе данных NCBI GeneBank.

При постановке ПЦР, на этапе выделения РНК, использовали отрицательный и положительный контроль реакции. В качестве положительного контроля использовали вакцинные штаммы 8544 и VC-03 метапневмовируса птиц и вакцинный штамм IB 4/91 вируса ИБК.

В результате ПЦР, проведенной с исследуемым вирусосодержащим материалом был зарегистрирован фрагмент длиной 291 п.н., что свидетельствует о наличии МПВ подтипа В (рис. 1).

Фрагмент ДНК длиной 501 п.н., характерный для МПВ подтипа А, в конечном продукте ПЦР не регистрировался, что свидетельствует об отсутствии его в исследуемом материале (рис. 2).

Регистрация фрагмента длиной 526 п.н. указывала на наличие вируса ИБК (рис. 3).

Образование данных фрагментов было строго специфично и не наблюдалось никаких фрагментов при добавлении кДНК МПВ подтипа А к праймерам подобранным к МПВ подтипа В и к вирусу ИБК, и наоборот. Для подтверждения специфичности праймеров определяли нуклеотидную последовательность ампликонов, полученных в ПЦР, и сравнивали их с гомологичными последовательностями в NCBI BLAST.

При анализе последовательности фрагмента гена G образца изолята, выделенного от цыплят, была обнаружена гомология 96% со штаммом GB 1407/06 и с изолятом UK/2016/54 МПВ подтипа В.

При анализе последовательности фрагмента гена S1 образца изолята полученного от цыплят, было установлено, что исследуемый изолят вируса ИБК имеет 89% гомологии со штаммом «4/91» (GenBank).

Таким образом, разработанные нами праймеры позволяют идентифицировать возбудителей респираторных болезней птиц, таких как МПВИ птиц и ИБК кур и провести серотипирование метапневмовируса птиц и вируса инфекционного бронхита кур методом электрофоретической детекции и секвенирования, основанных на ПЦР.

Установлена высокая специфичность разработанных праймеров, которые могут быть успешно использованы в ветеринарных лабораториях для диагностики данных болезней.

Molecular- biological diagnostics of respiratory diseases in birds.

Abgarian S.R. – senior researcher , **Nikitina N.In.** – PhD of biology sciences, acting head of the Department of virusology, **Semin A.N.** – PhD of vet.sciences, leading scientific worker "All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science" - Branch FNTS "VNITIP" RAS (VNIVIP).

ABSTRACT

Respiratory diseases of birds cause significant economic losses to poultry farming. In the analysis of these diseases, a significant role belongs to metapneumovirus infection in birds and infectious bronchitis in chickens. These diseases often occur in complex

with other viral and bacterial infections. Isolation of these viruses from the test material using known methods is a rather difficult and time-consuming process. The difficulty in isolation exists cause of the very short stage of accumulation of viruses in significant titers in the organs of birds. Therefore, nowadays, the main role in the correct diagnosis of these diseases belongs to molecular biological methods, in particular, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. The main objective of the research was to develop universal primers that allow the identification of pathogens of avian and IBC chickens, and serotyping of these viruses by electrophoretic detection and sequencing based on PCR. As a result of assays it was established that - presence of PCR products of the cDNA fragment with a length of 291 BP indicates the presence in the material RNA of SSV subtype, and the cDNA fragment with a length of 501 BP - for the RNA of SSV subtype A. the presence in the sample of the virus genome BC is confirmed by the detection of a fragment with a length of 526 BP. Obtained sequenced primers showed high specificity in relation to the diagnosed pathogens, which allows them to be successfully used in research institutions conducting work on the study of these viruses and molecular diagnosis of the corresponding infections.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болезни птиц / СПб: издатель В.А. Бакулин, издательский код по ОКВЭД 22.11.1, 2006. – С.164 - 166.
2. Джавадов Э.Д. Диагностика и профилактика новых инфекционных болезней птиц. // Farma Animals. – 2013. – №2(3). – С. 69-75.
3. Корелла Х.С. Проблемы с метапневмовирусом в стадах кур-несушек / Х.С. Корелла, В.В. Сафаров, Laboratorios hipra, s.c. // Журнал «Био». – 2013. – №5. – С. 29 -31.
4. Сухинин А.А. Положительные и отрицательные аспекты диагностического использования мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (REAL-TIME PCR) / Сухинин А.А., Макавчик С.А., Прасолова О.В. // Международный вестник ветеринарии. – 2016. – №1. – С. 41-45.
5. Cook, J.K.A. Avian rhinotracheitis // Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties. - 2000. - L.19. - P.602-613.

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятиях при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**