

УДК 619:578.835.1

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛАС ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА (ПЦР).

Нургазиев Р.З. (КНАУ им. К.И. Скрябина), Нургазиева А.Р. (КНИИВ им. А. Дуйшеева),
Крутская Е.Д. (КНИИВ им. А. Дуйшеева).

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, генотип, шт амкуриные эмбрионы, аллантоическая жидкость, РГА, ПЦР, реакционная смесь. **Key words:** Newcastle disease, genotype, strain, chicken embryos, allantoic fluid, HA, PCR reaction mixture.



РЕФЕРАТ

Болезнь Ньюкасла представляет собой большую угрозу птицеводству. Наиболее часто в Кыргызстане встречаются такие инфекционные болезни птиц: болезнь Ньюкасла, инфекционный ларинготрахеит, инфекционный бронхит и др. Резервуаром возбудителей могут быть перелетные

дикие птицы, а также домашние утки и гуси. По данным Государственной инспекции по ветеринарной и фитосанитарной безопасности при Правительстве Кыргызской Республики в августе 2012 года были зарегистрированы 4 неблагополучных пункта по болезни Ньюкасла. Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии научно-исследовательского института ветеринарии имени А. Дуйшеева. В качестве патологического материала были использованы легкие больных птиц, взятые во время вспышки болезни Ньюкасла в Кыргызской Республике в 2012–2016 гг. Целью нашей работы являлось, выявить вирус болезни Ньюкасла, провести серологические и молекулярно-биологические исследования. В лабораторных условиях, нами были проведены исследования болезни Ньюкасла для этого мы использовали куриные эмбрионы для накопления вируса. В дальнейшем из яиц собирали аллантоическую жидкость для постановки реакции при помощи молекулярно-биологического метода ПЦР, который показал следующие результаты. По результатам ПЦР анализа, из 15 проб в данных пробах 9, 11, 13, 15. был получен положительный результат, что говорит о наличии патогенного вируса, что подтверждает диагноз вызвавший заболевание у птиц болезни Ньюкасла. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет выявлять фрагменты генома вируса независимо от предшествующей вакцинации и уровня антител. Полученные данные будут использоваться для дальнейших исследований по проведению филогенетического анализа, для идентификации и определения штамма вируса.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Ньюкасла (БН) — это высоко-контагиозная болезнь птиц, из отряда куриных, проявляющаяся поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы.

Очень высокая эпизоотологическая опасность заболевания связана с разном инфекцией на различные континенты с

птицеводческой продукцией. Поэтому болезнь Ньюкасла-единственная из болезней птиц, включенная в список А (особо опасных болезней.) [1]

Болезнь Ньюкасла- РНК содержащий вирус из рода Paramyxovirus семейства Paramyxoviridae. Размер вириона 120-380 нм. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами, репродуцируется в 9 -

12 дневных куриных эмбрионах, вызывая их гибель, развивается во многих первичных и перевиваемых культурах клеток с образованием ЦПД. [2]

По степени патогенности штаммов вируса болезни Ньюкасла, циркулирующих в хозяйствах, различают: высокопатогенные - высокопатогенные, мезогенные - средней степени патогенности и лентогенные - низкой степени патогенности, или авирулентные. Кроме того, полевые штаммы вирусов могут отличаться тропизмом (способностью поражать отдельные органы и системы организма). Различают висцеротропные, энтеротропные, пневмотропные и политропные эпизоотические штаммы.

Вирус представляет большую угрозу домашней птице в связи с её высокой чувствительностью к вирусу. Болезнь является эндемической во многих странах. Вирус БН был обнаружен у 241 вида из 27 отрядов класса Птицы (Aves). [3]

Несмотря на введение вакцин для контроля с болезнью Ньюкасла более чем 60 лет назад. Болезнь Ньюкасла по-прежнему является одним из самых значимых заболеваний, поражающие птиц крупных птицеводческих ферм. В последние годы из-за использования вакцин в Кыргызстане эпизоотия болезни Ньюкасла не происходила. Однако спорадические вспышки заболевания все еще существуют. Интенсивные вспышки Болезни Ньюкасла произошли в Кыргызстане в 2015 и 2016 годах, сопровождались большими потерями домашней птицы. Нам удалось собрать патологические материалы от мертвых цыплят, чтобы филогенетически характеризовать циркулирующий штамм на территории Кыргызстана. В предыдущем исследовании вирусы Болезни Ньюкасла, выделенные в течение 2005 года, были филогенетически проанализированы и признаны генотипом VIIId. [4]

Успехи современной ветеринарной лабораторной практики часто зависят от того, удастся ли обнаружить патогенные вирусы, бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы у животных и в других объектах ветеринарного надзора. Извест-

но, что профилактику и лечение любой инфекционной болезни значительно облегчает ранняя и точная идентификация вызвавшего его патогенного агента. Для проведения диагностических тестов необходимо сначала вырастить культуру или накопить биомассу потенциального агента и лишь затем проанализировать его основные свойства то есть провести идентификацию.

Любой метод выявления патогенных агентов должен быть достаточно простым и обладать высокой специфичностью и чувствительностью. Специфичный диагностический тест должен давать положительный ответ только на искомый агент, чувствительный обнаруживать очень малые количества такого агента даже на фоне большого количества других агентов, находящихся в исследуемом образце.

Информация обо всем многообразии свойств любого организма заключена в его генетическом материале. Геном вирусов, как и других биологических объектов, является той уникальной структурой которая наиболее полно и адекватно отражает биологическую сущность данного вируса. Поэтому использование информации, заложенной в структуре нуклеиновых кислот, является надежным критерием их идентификации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии научно-исследовательского института ветеринарии имени А. Дуйшеева. В качестве патологического материала были использованы легкие больных птиц, взятые во время вспышки болезни Ньюкасла в Кыргызской Республике в 2012 –2016гг.

Используют куриные эмбрионы для обнаружения, титрования и накопления вируса для лабораторных исследований. В период с 5-го по 12-й день инкубации куриные эмбрионы могут быть использованы для заражения вирусом Ньюкасла. Инокулированные яйца каждые 24 часа проверялись на жизнеспособность эмбриона. В дальнейшем из яиц собирали аллантоисную жидкость и проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) на его способ-

ность гемагглютинации куриных эритроцитов. Качественную оценку РГА проводили по степени агглютинации клеток крови от «+» до «++++».[5]

Реакция гемагглютинации (РГА). Реакция гемагглютинации (РГА) проведена в соответствии с руководством ВОЗ по диагностике и контролю болезни Ньюкасла. РГА используется с целью определения наличия вируса в исследуемом материале и его титрования. Гемагглютинины входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в инфицированных вирусом аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах куриного эмбриона, в легких, печени и селезенке погибшей птицы, в жидкой и клеточной фракциях культур ткани.

В дальнейшем из яиц собирали аллантоисную жидкость для постановки реакции ПЦР. РНК была извлечена из инфекционных аллантоидных жидкостей с помощью ISOGEN II (NipponGene, Tokyo, Japan) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Обратную транскрипцию (RT) проводили с использованием набора RT SuperScript™ III Transcriptase (Invitrogen) в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл образца, 5 мкл воды, 4 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы, 1 мкл смеси dNTP, 2 мкл случайного праймера и 2 мкл DTT) при 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 60 мин, 65°C в течение 10 мин.

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси (2 мкл ДНК, 0,1 мкл полимеразы TAKAR Ex-Taq (TakaraBioInk., Киото, Япония), 1 мкл каждого прямого и обратного праймеров, 1,6 мкл 2,5 мМ смеси dNTP, 2 мкл 10X буфера для ПЦР, 12,3 мкл воды) в термоблокере (MyCycler, Bio-Rad, FosterCity, CA), используя следующее циклическое условие:

94°C в течение 5 мин	} 40 циклов
94°C в течение 30 с,	
52°C в течение 30 с	
72°C в течение 40 с	
72°C в течение 5 мин	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Современные тенденции разработки новых и совершенствования существующих методов и диагностических тест-систем направлены на повышение чув-

ствительности и специфичности при выявлении вирусных антигенов и соответствующих специфических антител.

Наиболее специфичным и чувствительным методом при исследовании болезни Ньюкасла является полимеразная цепная реакция. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет выявлять фрагменты генома вируса независимо от предшествующей вакцинации и уровня антител.

В лабораторных условиях, нами были проведены исследования болезни Ньюкасла при помощи полимеразной цепной реакции, который показал следующие результаты.

По результатам ПЦР анализа, указанным в таблице 1 видно, что в пробах 9, 11, 13, 15. получен положительный результат, что говорит о наличии патогенного вируса, что подтверждает диагноз вызвавший заболевание у птиц болезни Ньюкасла.

Дальнейшим этапом нашей работы будет проведение филогенетического анализа, для идентификации и определения штамма вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в области изучения вирусных болезней птиц и успех борьбы с этими инфекциями, связан с разработкой и внедрением в практику современных методов диагностики и специфической профилактики. Для диагностики и индикации вирусных болезней незаменимым оказался метод ПЦР, который открывает новые возможности повышения чувствительности и скорости обнаружения вирусов. В настоящее время ПЦР находит широкое применение в диагностической практике как экспресс метод диагностики, инфекционных болезней, вызываемых ДНК и РНК содержащими вирионами. В связи с этим нами были проведены ряд экспериментов при помощи ПЦР.

В результате проведенной экспериментальной работы и анализа полученных данных установлено, что неблагополучная эпизоотическая обстановка по болезни Ньюкасла в приграничной зоне вызывает реальную возможность заноса его возбудителя на территорию КР. Что и подтверждают наши исследования, где в

Таблица 1

Результаты ПЦР анализа

Пробы	Праймер forward	Праймер reverse	Результаты
1	FHN1-F	FHN1-R	отр
2	HN2-F	HN2-R	отр
3	HN3-F	HN3-R	отр
4	HNL4-F	HNL4-R	отр
5	FHN1-F	FHN1-R	отр
6	HN2-F	HN2-R	отр
7	HN3-F	HN3-R	отр
8	HNL4-F	HNL4-R	отр
9	FHN1-F	FHN1-R	полож
10	HN2-F	HN2-R	отр
11	HN3-F	HN3-R	полож
12	HNL4-F	HNL4-R	отр
13	FHN1-F	FHN1-R	полож
14	HN2-F	HN2-R	отр
15	HNL4-F	HNL4-R	полож

четырёх пробах куриного эмбриона был выявлен вирус болезни Ньюкасла.

DIAGNOSIS OF NEWCASTLE DISEASE USING THE MOLECULAR GENETIC METHOD (PCR).

Nurgaziev R.Z. - Rector of Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin (KNA Unamed K.I. Skryabin), Nurgazieva A.R. - head of laboratory Virology and Biotechnology of Kyrgyz Research Institute of Veterinary. (Kyrgyz Research Institute of Veterinary), Krytskaya E. D. - Leading Specialist of laboratory Virology and Biotechnology of Kyrgyz Research Institute of Veterinary (Kyrgyz Research Institute of Veterinary).

ABSTRACT

Newcastle disease is a big threat to poultry. Most often in Kyrgyzstan there are such infectious diseases of birds: Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, infectious bronchitis, etc. The reservoir of pathogens can be migratory wild birds, as well as domestic ducks and

geese. According to the State Inspectorate for Veterinary and Phytosanitary Security under the Government of the Kyrgyz Republic, in August 2012, 4 points were registered for Newcastle disease. Work carried out in the laboratory of Virology and Biotechnology Research Institute named after A. Duysheeva veterinary medicine. As a pathological material, we used lungs of sick birds taken during the outbreak of Newcastle disease in the Kyrgyz Republic in 2012 -2016. The purpose of our work was to identify the virus of Newcastle disease, to conduct serological and molecular biological studies. The investigation of Newcastle disease has been carried out under laboratory conditions, we have to do this, we used chicken embryos to accumulate virus. Subsequently, the allantoic liquid was collected from the eggs for the reaction using a molecular biological method of PCR, which showed the following results. Based on the results of PCR analysis, positive results were obtained from 15 samples

in these samples of 9, 11, 13, 15. This indicates a pathogenic virus, which confirms the diagnosis of the disease in Newcastle disease. Polymerase chain reaction (PCR) allows detection of fragments of the virus genome regardless of previous vaccination and antibody level. The obtained data will be used for carrying out further research on phylogenetic analysis, to identify and determine the strain of virus.

ЛИТЕРАТУРА

1. OIE, 2009. Newcastle disease. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. Office International des Epizooties, Paris, pp. 576–589, Chapter 2.3.14.
2. Лагуткин Н.А., Бакасарин С.Ш., Киселев О.В., Смирнов В.Н.
3. Ньюкаслская болезнь и парамиксовирусы. // Ветеринария. 1989 №9 С.30-33.
4. Инфекционные болезни животных. А.А.Сидорчук., Н.А. Масимов., В.Л. Крупальник. 2016 С. 751-756.
5. Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O., Korotetskiy, I., Zaitceva, I., Asanova, S., Kydyrmanov, A., Daulbaeva, K., Shakhvorostova, L., Sayatov, M., King, D., 2009. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998(2000), 2001, 2003. 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. Virus Genes 39, 94–101.
6. Диагностика вирусных болезней животных. З.Ляски. 1989. С 289-294.

ИНФОРМАЦИЯ

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**