

УДК 636.93:616.98:578.822-07:575.08
DOI:10.52419/issn2072-2419.2022.1.32

ДИАГНОСТИКА АЛЕУТСКОЙ БОЛЕЗНИ НОРОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА

Сухинин А.А. - д.б.н., проф. (ORCID 0000-0002-1245-3440), Гумберидзе М.М. – асп. (ORCID 0000-0003-0513-4430), Приходько Е.И. - к.в.н., доц., Сулян О.С. – асп. (ORCID 0000-0003-3493-0583), Виноходов В.О. - к.в.н., доц. (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Ключевые слова: ПЦР, норки, вирусный плазмодитоз, диагностика. **Key words:** PCR, mink, viral plasmocytosis, diagnostics.



РЕФЕРАТ

На сегодняшний день, пушное звероводство продолжает нести огромные убытки от Алеутской болезни норок. Зачастую, возбудитель попадает на территорию ферм вместе с вновь завезенным поголовьем норок в результате того, что применяемая в качестве диагностики реакция иммуно-электроосмофореза имеет низкую эффективность, если антитела еще не достигли определяемого уровня. Именно по этой причине актуальной становится проблема точной диагностики вирусного плазмодитоза у вновь завезенного карантинного поголовья на ранних этапах развития болезни. Исследование проводили при помощи ПЦР-диагностики проб фекалий от вновь ввезенного поголовья норок 30-и суточного возраста в зверохозяйство Северо-Западного региона. Перед отбором проб фекалий всех животных исследовали клиническими методами. ПЦР-диагностику проводили при помощи набора реагентов «Тест-система "АБН"» согласно инструкции производителя. По результатам проведенного опыта было установлено, что из 40 отобранных зверьков без клинических признаков болезни, у 29 удалось обнаружить ДНК возбудителя вирусного плазмодитоза. Таким образом, применение ПЦР-диагностики в качестве метода идентификации вируса Алеутской болезни норок для вновь завезенного поголовья, позволит предотвратить развитие и распространение болезни уже на ранних ее этапах.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, основной проблемой современного пушного звероводства по праву можно считать Алеутскую болезнь норок. Болезнь относится к плазмодитозам и характеризуется избыточным количеством плазматических клеток в различных органах и тканях, что приводит к развитию острой почечной недостаточности, кровотечений, анемии, а так же интерстициальной пневмонии у щенков [2,3]. Возбудитель болезни - парвовирус *Carnivore amdogarvovirus* способен персистировать в организме лисиц, песцов, со-

болей, хорьков, собак, кошек без проявления каких-либо признаков [1]. Обладая устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды, может скрытно распространяться на подстилку, оборудование и одежду обслуживающего персонала, тем самым создавать дополнительные источники и пути инфицирования [7,9]. Ко всему прочему, эффективных средств лечения и профилактики данной болезни на данный момент не разработано [3,8,10]. В результате, звероводческие хозяйства несут колоссальные убытки, по причине ухудшения качества пуш-

нины и значительной потери поголовья [5].

В настоящий момент, профилактика и контроль заболеваемости осуществляется путем скрининга антител у вновь ввозимого поголовья при помощи реакции иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ) и дальнейшей выбраковки больных животных [2,4,6,8]. Однако, несмотря на прилагаемые усилия, вирусный плазмодитоз по-прежнему продолжает вызывать серьезные эпизоотии, что подтверждает ограниченные возможности РИЭОФ для ранней диагностики Алеутской болезни норок [7]. Все дело в том, что данный метод основан на индикации противовирусных антител, которые, как отмечает Мартыненко, трудно обнаружить в течение 30 суток после инфицирования, а в опытах по экспериментальному заражению животных показано, что с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) вирус удается выявить уже на 5-е сутки после заражения [3,7]. Кроме того РИЭОФ, может не показать наличие инфицированного животного, если антитела еще не достигли определяемого уровня, а в случае использования имеющихся вакцин, поствакцинальные антитела и вовсе способны давать ложноположительный анализ [3,9,10]. Помимо прочего, метод взятия проб крови достаточно трудоемкий и болезненный для зверей [8]. Для того, чтобы предотвратить распространение вирусного плазмодитоза от вновь завезенного поголовья, необходимо диагностировать болезнь на раннем этапе развития, что требует применения высокочувствительных диагностических тестов, к которым сегодня относят полимеразную цепную реакцию [7].

Целью наших исследований являлось проведение и анализ результатов ПЦР-диагностики в качестве метода идентификации вируса Алеутской болезни норок для вновь ввозимого поголовья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». В качестве материала для исследования использовали пробы фека-

лий от вновь завозимого поголовья норок 30-и суточного возраста породы сапфир в зверохозяйство Северо-Западного региона. Зверьков помещали на карантин в двухрядные шеды, по одной норке на клетку. Кормление и поение зверей проводили, согласно стандартным рационам, вручную. Персонал для обслуживания животных был выделен отдельный, для исключения заражения основного поголовья. Перед отбором проб фекалий, всех зверьков исследовали клиническими методами: обращали внимание на общего состояние животных, положения тела в пространстве, поведения животного, телосложения (конституции), осматривали слизистые оболочки ротовой полости, кожи, шерстного покрова. Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом полимеразной цепной реакции. Для выделения ДНК, пробы фекалий массой по 1-3 г от 40 зверьков помещали в стерильные контейнеры при помощи одноразовых лопаток. Хранение и транспортировку осуществляли при температурном режиме 2-5°C. Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора комплекта реагентов экстракции ДНК из биологического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». Амплификацию специфического участка ДНК для вируса Алеутской болезни норок проводили с помощью коммерческого набора реагентов «Тест-система "АБН"» согласно инструкции производителя. Молекулярно-генетическое исследование проводили с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК Технологии») в 25 мкл реакционной смеси с горячим стартом при 95 °C в следующих режимах:

95 °C в течении 5 мин	} 42 цикла
95 °C в течении 10 сек	
63 °C в течении 10 сек	
72 °C в течении 10 сек	
72 °C в течении 1 мин	

Детекция продуктов амплификации проводилась методом электрофореза в 1% агаровом геле.

Статистическую обработку результа-

тов проводили с использованием компьютерной программы Statistika 10.0, (Stat.Soft, Inc., США) и Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническое обследование показало, что животные, участвующие в опыте, были очень подвижные, у всех наблюдалась активная реакция на внешние раздражители, тонус мышц у зверей был нормальным, судороги отсутствовали, аппетит сохранен, слизистые оболочки имели бледно-розовый окрас, а шерстный покров был гладким и без повреждений. В целом, признаков недомогания, вялости, а так же характерных для вирусного плазмодитоза симптомов животные не

демонстрировали. Дальнейшее проведенное ПЦР-исследование фекалий от норок показало наличие ДНК вируса Алеутской болезни у 72,5% от всех исследуемых животных. Результаты интерпретировали на основании наличия флуоресценции красителя ДНК-мишеней при помощи трансиллюминатора. Анализируя полученный результат электрофореза на рисунках 1 и 2 видно, что исследуемые пробы № 3,4,9,13,14,16-30,31-34,36-40. содержат генетический материал *Carnivore amdoparvovirus*, что может свидетельствовать о ранних этапах развития вирусного плазмодитоза у большей части исследуемых животных, при том, что характерных клинических проявлений болезни пока не наблюдалось.

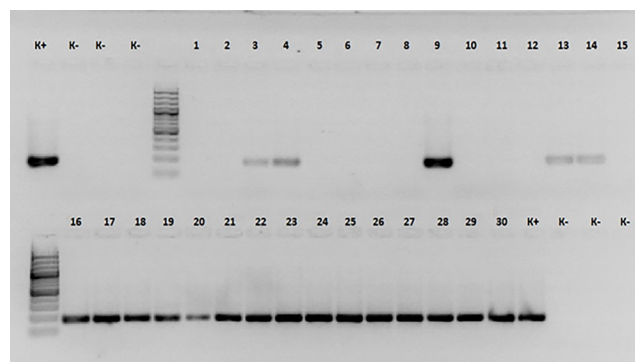


Рис. 1. Результаты электрофореза в агарозном геле. Пробы 3,4,9,13,14,16-30 – положительно реагирующие на наличие ДНК *Carnivore amdoparvovirus*; K+ – контроль положительный; K- – контроль отрицательный.

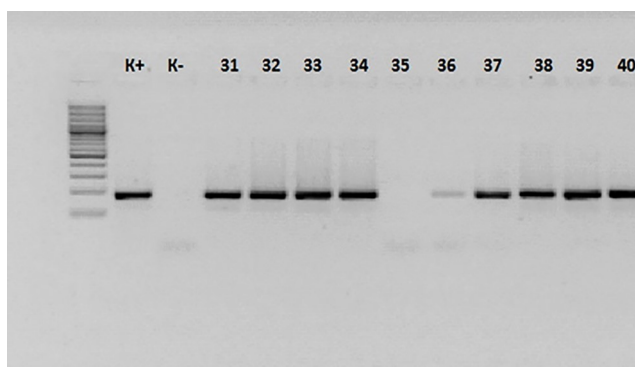


Рис. 2. Результаты электрофореза в агарозном геле. Пробы 31-34,36-40 – положительно реагирующие на наличие ДНК *Carnivore amdoparvovirus*; K+ – контроль положительный; K- – контроль отрицательный.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании полученных данных, можно сделать вывод, что во вновь завезенном в звероводческое хозяйство поголовье присутствуют зараженные Алеутской болезнью норки, которые подлежат выбраковке. Для успешной борьбы с вирусным плазмодитозом необходимо проводить своевременную и эффективную диагностику. Использование ПЦР в качестве подобного способа профилактики дает возможность обнаруживать вирус на ранних стадиях болезни, чего не нельзя сказать про РИЭОФ, что подтверждает постоянный рост заболеваемости [3]. Кроме того, возможность ПЦР – диагностики позволяют нам обнаруживать вирусную ДНК в корме животных, моче, фекалиях, в загрязненной подстилке и почве, а значит, и пресекать дополнительные источники и пути инфицирования.

Таким образом, применение ПЦР-диагностики в качестве метода идентификации вируса Алеутской болезни норки для вновь завозимого поголовья, позволит предотвратить развитие и распространение болезни уже на ранних ее этапах, а применение молекулярно-генетического метода в совокупности с реакцией иммуноэлектроосмосфореза позволит полностью оздоровить неблагополучные хозяйства.

DIAGNOSIS OF THE ALEUTIAN MINK DISEASE USING THE MOLECULAR GENETIC METHOD

A.A. Sukhinin¹ – Dr. Habil. (Biol. Sci.), professor, Gumberidze M.M.¹ – Postgraduate student, Gusev V. I.² – leading specialist in advanced research, Evsegneeva I. V.² – Development Director, Nikonov B. A.² – leading specialist, Becker G. P.² – General Director.

(1-St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 2 – LLC «Alloferon»)

ABSTRACT

Today, fur farming continues to incur huge losses because of the Aleutian mink disease. Frequently, the pathogen enters the territory of farms together with newly imported mink livestock, which is why the applied immunoelectroosmophoresis reaction has low efficiency if the antibodies have not

yet reached a certain level. So for this reason, the problem of accurate and early diagnosis of viral plasmocytosis in newly imported quarantine livestock becomes urgent. The study was carried out using PCR diagnostics of fecal samples from a newly imported population of minks of 30-day age in the fur farm of the North-Western region. Before taking fecal samples, all animals were examined by clinical methods. PCR diagnostics was performed using a set of reagents «Test system "ABN"» according to the manufacturer's instructions. According to the results of the experiment, it was found that out of 40 selected animals without clinical signs of the disease, 29 managed to detect the DNA of the causative agent of viral plasmocytosis. Thus, the use of PCR diagnostics as a method of identifying the Aleutian mink disease virus for newly imported livestock will prevent the development and spread of the disease already at its early stages.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Какарека, Н.Н. Разработка и получение иммунодиагностикума к вирусу Алеутской болезни норки / Н.Н. Какарека, Ю.Г. Волков, М. Ю. Щелканов // Ветеринария. – 2021. - №3. – С. 24-28.
2. Колесник, Е.С. Ранняя диагностика Carnivore amodarvovirus без экстракции ДНК / Е.С. Колесник, Г.Ю. Косовский, В.И. Глазко // Кролиководство и звероводство. – 2020. - №6. - С. 63-68.
3. Мартыненко, М.В. Использование полимеразной цепной реакции для детекции вируса Алеутской болезни норки / М.В. Мартыненко // Сельскохозяйственная биология. – 2004. - №6. – С. 119-122.
4. Сухинин А.А. Лабораторная диагностика вирусных болезней : учеб. Пособие. / А.А. Сухинин. - СПб., 2019. – 124 с.
5. Характеристика штаммов и изолятов вируса Алеутской болезни норки, циркулирующих на территории России // Н.А. Михеева-Святская, В.М. Макова, С.П. Яцентюк [и др.] // Ветеринария. – 2013. - №1. - С. 28-31.
6. Application of real-time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources // A. Prieto, J. M. Díaz-Cao, R. Fernández-Antonio [et al] // Veterinary Microbiology. – 2014. – Vol. 173. – P. 355-359.
7. Development and validation of nucleic

acid tests to diagnose Aleutian mink disease virus // J. Virtanen, K. Aaltonen, O. Vapalahti, T. Sironen // Journal of Virological Methods. – 2019. – Vol. 279. – P. 113776.

8. Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Aleutian mink disease virus // T. Lu, Y. Wang, Y. Wu [et al] // Arch Virol. – 2021. – Vol. 166(1). – P. 83-90.

9. Development of an EvaGreen-based real-time PCR assay for detection of Aleutian mink disease virus // L. Lia, Z. Hub, J. Sun [et al] // Journal of Virological Methods. – 2020. – Vol. 275. – P. 113751.

10. Farid A.H. Detection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (*Neovison vison*) 10 days postinoculation / A.H. Farid, I. Hussain, I. Arju // J. Vet Diagn. Invest. -2015. – Vol. 27(3). – P. 287-94.

УДК 619:616.98:616.476:578.2:616-032.22

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.1.36

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА VP2 ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ШТАММА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И СРАВНЕНИЕ ЕЁ С КЛАССИЧЕСКИМИ И ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ

Веретенников В.В.- асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана, Румянцев А.М. канд. биол. н (ФГБОУ ВО СПбГУ), Джавадов Э.Д. -д.в.н. проф. кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, Тарлава Н.В.- асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана (ФГБОУ ВО СПбГУВМ), Веретенников М.В. - студент 3 курса (ФГБОУ ВО МГУ)

Ключевые слова: Инфекционная бурсальная болезнь, классические штаммы, VP2, дендрограмма. **Key words:** Infectious bursal disease, classical strains, VP2, dendrogram.



РЕФЕРАТ

Вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) является возбудителем тяжелой иммуносупрессивной болезни молодняка птиц. Хотя впервые эта болезнь была обнаружена более 60 лет назад, она продолжает представлять значительную угрозу для птицеводства во всем мире [4]. Возбудителем является РНК-содержащий вирус, который принадлежит к роду *Avibirnavirus* семейства *Birnaviridae* [17].

В состав вириона входит пять вирусных белков, обозначенных как VP1, VP2, VP3, VP4 и VP5 [15] приблизительной молекулярной массой 97 кДа, 41 кДа, 32кДа, 28кДа и 21кДа, соответственно. Также отмечают и дополнительные белки, такие как VPX или pVP2 [12].

Капсидный белок VP2 уже давно остается в центре внимания разработки рекомбинантных субъединичных вакцин, поскольку отвечает за вызов защитного иммунного ответа против ИББ. Но сообщения многих авторов [2,3,6] указывают на антигенную неоднородность штаммов вируса ИББ, выделенных в России и других странах, с чем связывают неудачи применения существующих вакцин при профилактике заболевания, поэтому для создания и успешного применения рекомбинантных вакцин нужно изучать и эпизоотические штаммы, выделенные на территории Российской Федерации.

Поэтому целью данной работы было провести генетический анализ гена VP2 эпизоо-