

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ

Дмитриева М.Е.¹, Занько М.А.², Балендор Е.В.³

¹Дмитриева Маргарита Евгеньевна – кандидат ветеринарных наук, директор;

²Занько Мария Александровна – научный сотрудник,
отдел вирусологии и опухолевых болезней птиц,
Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства,
г. Санкт-Петербург;

³Балендор Евгений Валентинович – директор по выращиванию, главный ветеринарный врач,
ООО «ТПК «Балтптицепром», г. Калининград

Аннотация: в статье представлены результаты молекулярно-биологических исследований изолятов вируса инфекционной анемии цыплят, выделенных на территории Российской Федерации от птицы различного технологического направления выращивания.

Ключевые слова: инфекционная анемия цыплят, вирус, диагностика, молекулярно-биологические исследования.

Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) – контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся выраженной иммуносупрессией, поражением лимфоидных органов, подкожными и внутримышечными кровоизлияниями [1, 2, 3, 6]. Впервые инфекционная анемия цыплят (Infectious chicken anemia) была зарегистрирована в Японии в 1979 году [5, 8]. В России циркуляция вируса ИАЦ впервые была установлена в 2000 году на одной из птицефабрик. Болезнь отмечалась у цыплят 25-40-суточного возраста и сопровождалась бледностью клюва, гребня, нижних конечностей, кровоизлияниями в мышцах голени, бедра, груди и крыльев, атрофией фабрициевой сумки и тимуса, изменением костного мозга до светло-желтого или светло-серого [4].

В настоящее время болезнь широко распространена не только среди цыплят-бройлеров, но и в промышленных стадах кур-несушек.

Биологические свойства вируса ИАЦ недостаточно изучены. Выделение возбудителя ИАЦ классическими методами как с использованием культуры клеток MDCC-MSB1, так и с использованием СПФ-куриных эмбрионов затруднено. Это связано с тем, что для выявления вируса ИАЦ в культуре клеток в Российской Федерации не разработаны диагностикумы, а при культивировании в развивающихся куриных эмбрионах (РЭК) большинство штаммов и изолятов вируса не вызывают видимых поражений.

Наиболее приемлемым методом детекции вируса ИАЦ является полимеразно-цепная реакция (ПЦР). Полимеразно-цепная реакция позволяет выявлять вирус ИАЦ в патологическом материале, при культивировании вируса в культуре клеток и в развивающихся куриных эмбрионах, при постановке биопробы в процессе определения полноты инактивации вируса. При использовании форезного метода детектирования можно осуществить только качественный анализ. ПЦР в реальном времени позволяет получать количественные данные о содержании ДНК в пробе путем определения порогового цикла по кинетической кривой ПЦР РВ и построения градуировочной кривой. Применяемая в настоящее время цифровая ПЦР представляет собой третье поколение технологии ПЦР. Цифровая ПЦР определяет количество копий ДНК- мишени в пробе с высокой точностью и достоверностью. Данная технология может быть применима, как альтернатива титрации, для количественной оценки репликации вируса в биологических системах, а также для определения иммунизирующей дозы вируса и количества доз при производстве вакцин против ИАЦ. Молекулярно-биологические методы обладают высокой специфичностью, чувствительностью, относительной простотой и быстротой выполнения анализа.

Целью настоящей работы явилось определение штамма и изучение структуры генома возбудителя ИАЦ, выделенного из патологического материала от цыплят-бройлеров (проба № 1) и от кур-несушек (проба № 2) с характерными патологоанатомическими признаками болезни, такими как апластическая анемия, кровоизлияния в мышцах, атрофия тимуса, наличие серозно-слизистого экссудата в фабрициевой сумке и подкожных инфильтратов в области крыльев и брюшной полости. Для исследования отбирали образцы печени и костного мозга.

Для проведения полимеразной цепной реакции и секвенирования был разработан набор специфических олигонуклеотидов на основании известных последовательностей генов, полученных из банков данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Синтез олигонуклеотидных праймеров произведен ООО «Бигль». Для амплификации области VP1 вируса ИАЦ использовались праймеры VP1F: 5'-AGCCGACCCCGAACCGCAAGAA-3' и VP1R: 5'-TCA GGG CTG CGT CCC CCA GTA CA-3'.

Выделение ДНК осуществляли с применением лицензированных коммерческих наборов (ДНК-сорб, «AmpliSens», Россия).

ПЦР-амплификацию проводили в ПЦР-буфере, который содержал 2,0 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP, 10 пмоль каждого праймера и 0,1 ед./мкл Дна Таq полимеразы в 25 - общий объем реакции. Реакцию амплификации проводили в программируемом амплификаторе «Терцик» (ДНК технология, Россия) по следующей схеме: денатурацию при 95⁰С в течение 5 мин-1цикл. Последующие 35 цикла состояли из денатурации ДНК при 95⁰С в течение 10сек., отжига праймеров при 60⁰С - 20сек., элонгации кДНК при 72⁰С - 20сек, и заключительного удлинения при 72⁰С в течение 3 мин.

В качестве положительного контроля использовали образец, содержащий вакцинный штамм «Сух-1». Смесь ПЦР использовали в качестве отрицательного контроля. Для каждого образца экстракцию ДНК и ПЦР проводили дважды.

Анализ фрагментов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,7% агарозном геле, содержащем бромистый этидий концентрации 0,5 мкг/мл. Гели фотографировали и анализировали, используя траниллюминатор с длиной волны 269 нм. Размер фрагмента генома вируса ИАЦ составлял 350 п.н.

Выделение ДНК-фрагментов из геля проводили насыщенным раствором ацетата аммония. Для реакции секвенирования брали 50 нг. ДНК, 5 pmol праймера, набор «DYEnamic ET terminator kit». Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе MegaBase 1000 согласно рекомендациям производителя.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием программы Vector-NTI. Полученные секвенированные последовательности анализировали в генетических базах данных с использованием онлайн-приложения NCBI Blast.

Были определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена VP1 и проведен их сравнительный анализ с другими штаммами и изолятами вируса ИАЦ из базы данных PubMed. При анализе последовательности фрагмента гена VP1 образца изолята, выделенного от цыплят-бройлеров, была обнаружена гомология 89% с изолятом CN_BR-37 и штаммами JS-China 78, AN-China 32 (GeneBank). При анализе последовательности фрагмента гена VP1 образца изолята, полученного от кур-несушек, была обнаружена гомология 96% с изолятом CN_BR-37 и штаммом JS-China 78 (GeneBank).

В результате проведенных исследований было установлено, что оба выделенных изолята имеют высокий процент гомологии с одними и теми же изолятами и штаммами, что подтверждает литературные данные об отсутствии отличий в антигенной структуре всех штаммов ИАЦ и их принадлежности к одному серотипу [1, 7, 8].

Список литературы

1. Бакулин В.А. Болезни птиц. СПб.: ОАО «Издательское полиграфическое предприятие «Искусство России», 2006. 688 с.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Под ред. Б.У. Кэлнека [и др.] // Пер. с англ. 10-е изд. М.: АКВАРИУМ БУК, 2003. 1232 с.+32 с. вкл.
3. Инфекционная анемия цыплят. Диагностика и профилактика / М.Е. Дмитриева, Э.Д. Джавадов, Е.С. Людьева // СПб.: РК «Агат», 2011. 40 с.
4. Инфекционная анемия цыплят / Э.Д. Джавадов, В.И. Смоленский, Ф.С. Кудрявцев, Ф.И. Полежаев // Ветеринария, 2001. № 9. С. 19-22.
5. Инфекционная патология животных: в 2 т. / А.Я. Самуйленко [и др.]. Под ред. А.Я. Самуйленко [и др.] // М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. Т. 1. 1911 с.
6. Инфекционная анемия цыплят: методическое пособие / А.С. Алиев [и др.] // СПб.: Изд. ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2013. 52 с.
7. McNulty M.S. Chicken anemia agent (CAA): a review // Avian Pathol., 1991. V. 20. P. 187-203.
8. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolated of chicken anemia agent (CAA) / Yuasa N., Imai K. // Avian Pathol., 1986. V. 5. P. 639-645.