

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ,
ВЫЯВЛЕННОГО ОТ ДОМАШНИХ СОБАК
НА ТЕРРИТОРИИ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CANINE DISTEMPER VIRUS IDENTIFIED FROM DOMESTIC DOGS
IN THE TERRITORY OF THE KYRGYZ REPUBLIC**

Ключевые слова: вирус чумы плотоядных, субтипы, филогенетический анализ, H-ген, секвенирование.

Keywords: canine distemper virus, subtypes, phylogenetic analysis, H-gene, sequencing.

Проведено секвенирование участка H-гена вируса чумы плотоядных, выделенного на территории Кыргызской Республики от домашних собак. С помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей H-гена полевого штамма, циркулирующего на территории Кыргызской Республики, и данными GenBank установлена его принадлежность к роду Morbillivirus, виду Canine Distemper virus. Филогенетическим анализом нуклеотидных последовательностей H-гена установлено, что полевой штамм вируса чумы плотоядных относится к группе «Arctic-like».

The sequencing of the H-gene site of canine distemper virus identified on the territory of the Kyrgyz Republic from domestic dogs was carried out. By using the comparative analysis of the H-gene nucleotide sequences of the field strain circulating in the territory of the Kyrgyz Republic and the GenBank, its belonging to the genus Morbillivirus, the species Canine distemper virus, was determined. The phylogenetic analysis of the H-gene nucleotide sequences revealed that field strain of canine distemper virus belonged to the Arctic-like group.

Исакеев Майрамбек Кыдыралиевич, м.н.с., Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: maku-0711@mail.ru.

Isakeyev Mayrambek Kydyraliyevich, Junior Staff Scientist, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: maku-0711@mail.ru.

Крутская Екатерина Дмитриевна, к.в.н., вед. н.с., Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: katysha_dm@mail.ru.

Krutskaya Yekaterina Dmitriyevna, Cand. Vet. Sci., Leading Staff Scientist, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: katysha_dm@mail.ru.

Мамытова Айгуль Табалдыевна, к.б.н., с.н.с., Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: aigulmamytova@gmail.com.

Mamytova Aygul Tabaldyevna, Cand. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: aigulmamytova@gmail.com.

Нургазиева Асел Рысбековна, к.б.н., с.н.с., Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: nurgazieva10@gmail.com.

Nurgaziyeva Asel Rysbekovna, Cand. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: nurgazieva10@gmail.com.

Введение

В настоящее время чума плотоядных регистрируется среди домашних, промышленных и диких плотоядных на всех континентах мира. Чума человечеству известна с древних времен, с момента одомашнивания собак. Аристотель в своих трудах описывал ее как ангину. Вирусную природу чумы впервые доказал француз Карре в 1905 г. Грин (1925 г.) диагностировал чуму у серебристо-черных лисиц, Рудольф

(1928 г.) и В.И. Миролубов (1932 г.) – у енотов и норок.

Чума плотоядных – высококонтагиозная вирусная болезнь плотоядных животных, характеризуется лихорадкой, острым катаральным воспалением слизистых оболочек глаза, дыхательных путей, расстройством желудочно-кишечного тракта, кожной экзантемой и поражением нервной системы. Болезнь в виде эпизоотий наблюдается во всем мире. К вирусу восприимчивы собаки,

серебристо-черные лисицы, песцы, уссурийские еноты, хорьки, соболи, медведи, ласки, горностаи, волки, барсуки, куницы, выдры, шакалы, гиены [1].

Из литературных источников известно, что ведущее место в инфекционной патологии плотоядных, в частности собак, занимает чума плотоядных. По мнению многих ученых мира, чума плотоядных является одной из древнейших болезней собак, сопровождается высокой их смертностью. На сегодняшний день ни при одной другой болезни ветеринарные врачи не ставят такое огромное количество ошибочных диагнозов, как при чуме плотоядных. Многие авторы связывают этот факт с высоким полиморфизмом генома вируса чумы плотоядных, приводящим к различным изменениям при клиническом течении болезни [1-3]. Поэтому генетические особенности штаммов возбудителя чумы плотоядных играют важную роль.

По мнению многих авторов, вирус чумы плотоядных создает угрозу сохранению исчезающих видов плотоядных животных [4]. Согласно классификации возбудитель чумы плотоядных относится к семейству парамиксовирусов, рода морбилливирус. К этой же группе относится вирус кори человека, чумы крупного рогатого скота, чума мелких жвачных и ряда других болезней [1, 3, 5]. Возбудителем чумы плотоядных является одноцепочечный РНК-содержащий вирус размером около 150 и 300 нм. Геном возбудителя состоит из 15 690 нуклеотидов с шестью непрерывными структурными генами, известными как нуклеокапсид (N), фосфопротеин (P), матрикс (M), белок слияния (F), гемагглютинин (H) и полимеразы (L) [6, 7]. При изучении филогенетической характеристики названных генов многие авторы используют ген «Hemagglutinin», который несет ответственность за синтез поверхностного белка hemagglutinin. Данный белок функционально ответствен за адсорбцию вируса в клетку, также в его структуре отмечается высокая вариабельность, он активно участвует в иммунологических реакциях [8]. С этими свойствами некоторые авторы связывают тропизм вируса к различным тканям, что впоследствии определяет клинические проявления болезни в виде кожных, респираторных, нервных или кишечных патологий [9].

Штаммы чумы плотоядных по географическому расположению и генетической характеристике сильно варьируют и разделены на следующие группы: America-1; America-2; Asia-1; Asia-2; Asia-3; Artic-like;

Africa; Europe и Europe-Wildlife, что показано в результатах наших исследований [10].

Поэтому для ветеринарной науки очень важно провести наблюдение за эволюционным развитием различных штаммов возбудителя чумы плотоядных. Это поможет более эффективно применить имеющиеся профилактические препараты и организовать меры борьбы с данным заболеванием.

Материалы и методы

Вирусный материал был собран в течение 2014-2015 гг. от животных города Бишкек. Полученные образцы были подтверждены с помощью ПЦР анализа на наличие возбудителя вируса чумы плотоядных.

Выделение РНК. Для выделения РНК использовали специальный коммерческий набор американского производства Axugen (Axy PrepTM Body Fluid, Viral DNA/RNA miniprep kit. Cat No.: AP-MN-BF-VNA-250) в соответствии с наставлением по применению данного набора.

Проведение ОТ-ПЦР. Обратную транскрипцию РНК проводили специальным набором фирмы Qiagen. После получения кДНК ПЦР проводили специфичными праймерами NP1-5' – ATTTGGGATTGCTTAGGA – 3', NP2-5' – GGCGCTCATCTTGGACAT – 3'. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 2,0%-ном агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в ТАЕ буфере. Выявление ПЦР продуктов в геле проводили на УФ-трансиллюминаторе. Гель фотографировали с помощью цифровой документирующей системы BIO-RAD Gel Doc XRTM+ imaging system. Обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерной программы Lab imaging system.

Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей. Реакцию секвенирования выполняли по методу Сенжера с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование ДНК проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно протоколам производителя. Расшифровку электрофореграмм осуществляли программой Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems, США). Сборку и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации и построение филогенетического дерева, анализ соответствия нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA6, поиск гомо-

логичных последовательностей в базе GenBank – с помощью программы BLAST.

Для установления филогенетических связей вируса чумы плотоядных по географическому расположению были использованы 56 штаммов и изолятов, циркулирующих на территории различных стран мира.

Результаты исследований

В городе Бишкек в 2015 г. регистрировалась массовое заболевание собак с неизвестной этиологией, летальность составляла около 80%. Нами была поставлена задача – выяснить причины массового падежа животных. Все клинические признаки павших животных указывали на вирусную этиологию, то есть на наличие возбудителя вируса чумы плотоядных. Для точного определения этиологии проведена лабораторно-дифференциальная диагностика с клинически схожими заболеваниями с помощью ПЦР диагностики. Дифференциацию проводили по следующим заболеваниям: пироплазмоз, парвовирусный гастроэнтерит, гепатит, парагрипп собак и сальмонеллез. Полученные результаты показаны ниже по таблице.

Таблица

Результаты ПЦР анализа

№	Названия болезней	Результаты ПЦР анализа
1	Пироплазмоз	отрицательный
2	Парвовирусный гастроэнтерит	отрицательный
3	Гепатит	отрицательный
4	Парагрипп собак	отрицательный
5	Сальмонеллез	отрицательный
6	Чума плотоядных	положительный

После подтверждения ПЦР анализа наличие чумы плотоядных стояла задача ликвидации очагов заражения и контроль эпизоотологической ситуации в стране. Так как на сегодняшний день в мире целенаправленных методов лечения больных чумой животных не разработано, эффективной мерой борьбы остается вакцинация незараженных животных с использованием различных моно- и ассоциированных вакцин. В их основе лежат модифицированные аттенуированные штаммы Рокборн и Ондестепорт [11].

Однако в последнее время учеными выявлены субтипы возбудителя, при которых вакцины не эффективны [12]. Их появление объясняется тем, что штаммы вируса чумы плотоядных с изменением геномных последовательностей приобретают новые биологические свойства. Поэтому для целена-

правленной профилактики и контроля эпизоотологической ситуации в стране необходимо было установить филогенетическую принадлежность полевого штамма чумы плотоядных. Несмотря на различие вирулентности и характера проявления клиники, все выделенные штаммы в мире обладают общими биологическими свойствами, позволяющими отнести их в одну группу [10].

Для установления филогенетической принадлежности полевого штамма возбудителя проведено секвенирование участка гена Н, так как этот ген отвечает за вирулентность вируса, и в его структуре отмечается высокая вариабельность. По результатам секвенирования проведено сравнение выделенного полевого штамма с другими штаммами чумы плотоядных в интернет-базе данных GeneBank с помощью пакет программ MEGA6. Полученные результаты приведены на рисунке.

Филогенетическое дерево построено с помощью программы Mega 6 по методу Neighbor Joining по алгоритму Minimal evolution с построением укорененных дендрограмм при количестве реплик в bootstrap 1000.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей в области Н-гена позволил установить, что полевой штамм KR-2015, выделенный на территории Кыргызской республики, относится к географической группе «Artic-like». К этой же группе относятся штаммы, циркулирующие в России, Китае, Гренландии, Италии и других странах мира.

По результатам филогенетического дерева штаммы чумы плотоядных распределены в следующей последовательности:

1. America-1 – группа, объединяющая вакцинные штаммы Conovac, Lederle, Onderstepoort и Snyder-hill и изоляты, циркулирующие среди енотов США, Казахстанские штаммы Shuskiy, Dog-2007 и Caspian/2007.

2. America-2 – к этой группе относятся штамм «Javelina» и изоляты, циркулирующие на территории США среди леопардов, собак и енотов.

3. Asia-1 – группа, объединяющая изоляты, циркулирующие на территории Китая, Японии и Тайваня, выделенные от собак и енотов.

4. Asia-2 – к этой группе относятся в основном штаммы, циркулирующие на территории Японии, которые были выделены от домашних собак.

5. Asia-3 – группа новых штаммов, циркулирующих на территории Китая.

6. Artic-like – к этой группе относятся штаммы, циркулирующие в России, Гренландии, Кыргызстане и других странах.

7. Africa – группа штаммов, циркулирующих в странах Африки.

8. Europe – группа изолятов, выделенных от собак в Италии, Турции, Венгрии, Германии и Дании.

9. Europe-Wildlife – группа изолятов, выделенных от панд (Китай), хорьков (Германия), норок (Дания) и лисиц (Италия).

Заключение

Изменения эколого-климатических условий, происходящие в мире, повлияли на молекулярно-генетические свойства возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе на вирус чумы плотоядных. Так, недавно появившийся генетически измененный изолят вируса чумы плотоядных поражает и приматов. Расширяется круг восприимчивых к вирусу организмов. Отсюда есть опасение, что дальнейшие изменения в генетике возбудителя могут вызвать и заражение человека чумой. В данной работе установлена причина массовой гибели домашних собак, а также филогенетические данные возбудителя чумы плотоядных циркулирующего на территории Кыргызской Республики. Эти данные могут быть использованы при эпизоотологическом прогнозе и выборе вакцинных штаммов для профилактики чумы плотоядных.

Библиографический список

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 2001. – С. 928.
2. Груздев К.Н., Селиванов А.В. Чума плотоядных. – М., 1996. – С. 15-21.
3. Appel M.J. Pathogenesis of canine distemper // Am. J. Vet. Res. – 1969. – Vol. 30 (7). – P. 1167-1182.
4. Appel M.J., Yates R.A., Foley G.L., Bernstein J.J., Santinelli S., Spelman L.H., Miller L.D., Arp L.H., Anderson M., Barr M., et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1994. – Vol. 6 (3). – P. 277-288.
5. Pringle C.R. The order Mononegavirales – current status // Archives of Virology. – 1997. – Vol. 142. – P. 2321-2326.
6. Diallo A. Morbillivirus group: genome organisation and proteins // Veterinary Microbiology. – 1990. – Vol. 23 (1-4). – P. 155-163.
7. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. (Eds.), Veterinary Virology, 3rd ed., Academic Press, San Diego, 1999.
8. von Messling V., Zimmer G., Herrler G., Haas L., Cattaneo R. The haemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75 (14). – P. 6418-6427.
9. Bolt G., Jensen T.D., Gottschalck E., Arctander P., Appel M.J., Buckland R., Blixenkrone-Moller M. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus // Journal

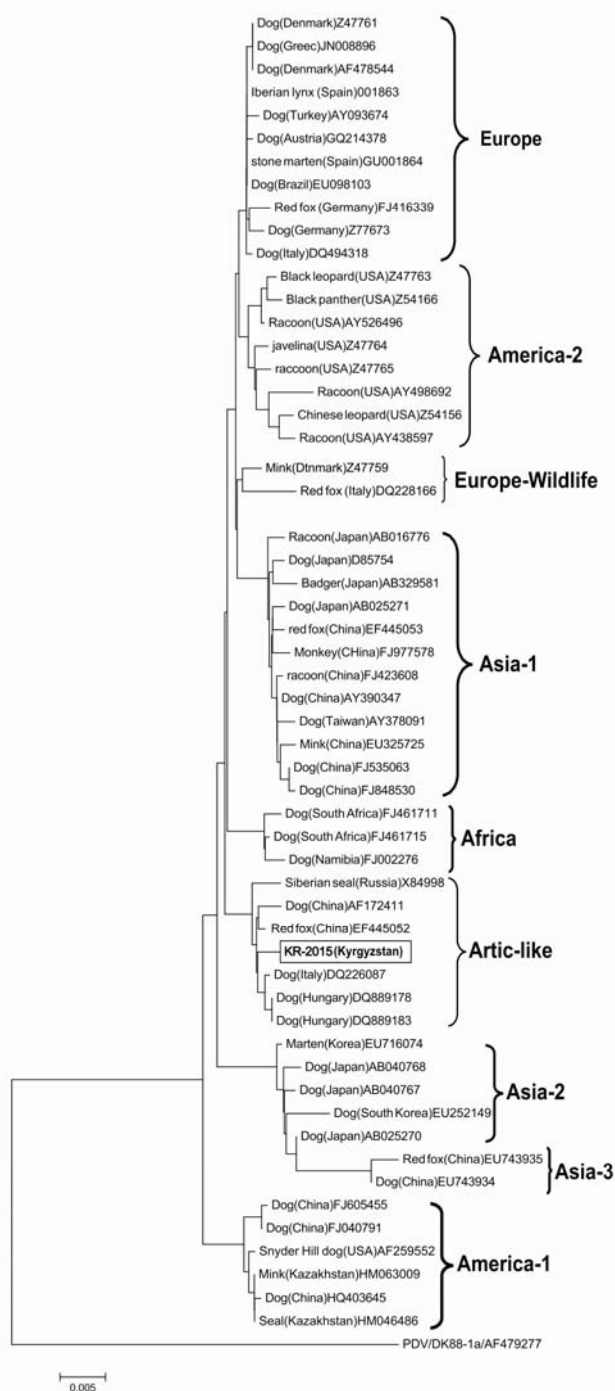


Рис. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вируса чумы плотоядных, выявленных от домашних собак на территории Кыргызской Республики

of General Virology. – 1997. – Vol. 78 (2). – P. 367-372.

10. Harder T.C., Osterhaus A.D. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? // Trends in Microbiology. – 1997. – Vol. 5 (3). – P. 120-124.

11. Haas L., Martens W., Greiser-Wilke I., Mamaev L., Butina T., Maack D., Barrett T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany // Virus Research. – 1997. – Vol. 48 (2). – P. 165-171.

12. Lednicky J.A., Meehan T.P., Kinsel M.J., Dubach J., Bocchetta M., Hungerford L.L., Sarich N.A., Witeki K.E., Braid M.D., Pedrak C., Houde C.M. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes // Journal of Virological Methods. – 2004a. – Vol. 118. – P. 147-157.

References

1. Syurin V.N., Samuilenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Virusnye bolezni zhivotnykh. – M.: VNITIBP, 2001. – S. 928.

2. Gruzdev K.N., Selivanov A.V. Chuma plotoyadnykh. – M., 1996. – S. 15-21.

3. Appel M.J. Pathogenesis of canine distemper // Am. J. Vet. Res. – 1969. – Vol. 30 (7). – P. 1167-1182.

4. Appel M.J., Yates R.A., Foley G.L., Bernstein J.J., Santinelli S., Spelman L.H., Miller L.D., Arp L.H., Anderson M., Barr M., et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1994. – Vol. 6 (3). – P. 277-288.

5. Pringle C.R. The order Mononegavirales – current status // Archives of Virology. – 1997. – Vol. 142. – P. 2321-2326.

6. Diallo A. Morbillivirus group: genome organisation and proteins // Veterinary Microbiology. – 1990. – Vol. 23 (1-4). – P. 155-163.

7. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. (Eds.), Veterinary Virology, 3rd ed., Academic Press, San Diego, 1999.

8. von Messling V., Zimmer G., Herrler G., Haas L., Cattaneo R. The haemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75 (14). – P. 6418-6427.

9. Bolt G., Jensen T.D., Gottschalck E., Arctander P., Appel M.J., Buckland R., Blixenkrone-Moller M. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus // Journal of General Virology. – 1997. – Vol. 78 (2). – P. 367-372.

10. Harder T.C., Osterhaus A.D. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? // Trends in Microbiology. – 1997. – Vol. 5 (3). – P. 120-124.

11. Haas L., Martens W., Greiser-Wilke I., Mamaev L., Butina T., Maack D., Barrett T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany // Virus Research. – 1997. – Vol. 48 (2). – P. 165-171.

12. Lednicky J.A., Meehan T.P., Kinsel M.J., Dubach J., Bocchetta M., Hungerford L.L., Sarich N.A., Witeki K.E., Braid M.D., Pedrak C., Houde C.M. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes // Journal of Virological Methods. – 2004a. – Vol. 118. – P. 147-157.



УДК 636:619:579

В.Г. Луницын, Е.Ю. Должикова
V.G. Lunitsyn, Ye.Yu. Dolzhikova

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ОБСЕМЕНЕННОСТЬ ПРОДУКЦИИ ПАНТОВОГО ОЛЕНЕВОДСТВА НА ЭТАПАХ ПЕРЕРАБОТКИ В БИОСУБСТАНЦИИ

THE BACTERIAL LOAD OF VELVET ANTLER DEER BREEDING PRODUCTS AT THE PROCESSING STAGES INTO BIO-SUBSTANCES

Ключевые слова: панты, кровь, половые органы самцов, хвосты, жилы, плоды маток, измельченное сырье, гидролизат, концентрат, жмых, бактериальная обсемененность.

Keywords: velvet antlers, blood, male genital organs, tails, veins, fetuses, crushed raw materials, hydrolyzate, concentrate, cake, bacterial load.