kov, G.A. Veselkin. – M.: Agropromizdat,1990. – 239 s.

2. Parazitologiya i invazionnye bolezni zhivotnykh / M.Sh. Akbaev, F.I. Vasilevich, R.M. Akbaev i dr.; pod red. M.Sh. Akbaeva. – 3-e izd., pererab. i dop. – M.: KolosS, 2008. – S. 622-637.

3. Kerbabaev E.B. Osnovy veterinarnoi akarologii // Metody i sredstva bor'by s kleshchami / Tr. Vseros. in-ta gel'mintologii. – 1998. – T. 34. – 220 s.

4. Osnovy veterinarnoi parazitologii: uchebnik dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedenii / K.P. Fedorov, A.S. Donchenko, F.I. Vasilevich, I.M. Zubareva. – 2-e izd., pererab. i dop. – Novosibirsk, 2013. – S. 370-373, 393.

5. Denis Heitz. Implement for removing parasitic ticks from the skin of animals or humans. EP 0821571 B1. – PCT / FR 1996/000812, Application number EP 19960920869, Bibliographic data – 1998-09-30. – 4 p.

6. Kravchenko I.A., Razumovskaya V.V. Dirofilyarioz sobak v Altaiskom krae: kharakteristika vozbuditelya, diagnostika i mery bor'by: nauchnye rekomendatsii. – Barnaul: RIO Altaiskogo GAU, 2015. – S. 23-27.

7. Sterlina T.S., Kolesnikova N.A., Novik T.S., Oseev V.A., Drinyaev V.A. Demodekoz sobak: novaya substantsiya na osnove avermektinov dlya sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov // VETPHARMA. – 2012. – № 5. – S. 25-29.

✦ ✦ ✦

УДК 619:616.98:578.831.1БН

Р.Т. Абдылдаева, Э.К. Акматова, Ж.А. Атамбекова, А.А. Камарли
R.T. Abdyldayeva, E.K. Akmatova, Zh.A. Atambekova, A.A. Kamarli

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

NEWCASTLE DISEASE DIAGNOSIS USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Ключевые слова: *болезнь Ньюкасла, геном, цыплята, ткани легких, диагностика, возбудитель болезни, ИФА, выделение РНК, ОТ-ПЦР, праймеры.*

Несмотря на то, что за последние годы наука и практика обогатились новыми сведениями по эпидемиологии, этиологии и патогенезу болезни Ньюкасла, а также были попытки создать надежные программы профилактики, это заболевание остается одним из самых опасных в птицеводстве, несмотря на все. В природе широко распространены вирусные возбудители болезней, которые ярко проявляют свое присутствие, вызывая специфические заболевания среди восприимчивых птиц. Обнаружение вирусного возбудителя дает возможность ставить соответствующий диагноз на заболевания. Сложная эпизоотологическая ситуация по болезни Ньюкасла является серьезной преградой для обмена генетическим материалом сельскохозяйственной птицы. Новые вирусы, вызывающие инфекционные заболевания птиц, требуют изменения подхода к мониторингу и их диагностике в промышленном птицеводстве. Исходя из этого наиболее эффективным средством борьбы с болезнями птиц является вакцинация. Даны биологическая характеристика вируса болезни Ньюкасла и ее диагностики с применением ПЦР исследования с обратной транскрипцией со специфическими праймерами. Ранняя диагностика имеет исключительно важное значение для предупреждения и ликвидации возникновения новых очагов.

Keywords: *Newcastle disease, genome, chickens, lung tissue, diagnostics, infecting agent, ELISA, RNA isolation, RT-PCR, primers.*

Despite the fact that in recent years the science and practice have gain new information on epidemiology, etiology and pathogenesis of Newcastle disease, this disease remains one of the most dangerous in the poultry industry, in spite of all attempts to create a robust prevention programs. A widespread nature of viral pathogens clearly shows their presence and causes specific diseases among susceptible birds. The detection of viral causative agent makes it possible to put a diagnosis on the disease. The complex epidemiological situation for Newcastle disease is a serious obstacle for the exchange of genetic material of poultry. New viruses that cause infectious disease in birds require a change in approach to monitoring and diagnostics in the poultry industry. On this basis, the most effective means of dealing with avian disease is vaccination. The biological characteristic of Newcastle disease virus and its application to diagnostic PCR studies with specific reverse transcription primers are discussed. Early diagnosis is crucial to prevent and eliminate the appearance of new foci.

Абдылдаева Роза Тынайбековна, м.н.с., лаб. эпизоотологии, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: roza.abdyldaeva.80@mail.ru.
Акматова Эльмира Казакбаевна, д.б.н., с.н.с., зав. лаб. болезней домашних животных, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: akmatova_elmira@mail.ru.
Атамбекова Жылдыз Абдигапаровна, м.н.с. лаборатории бруцеллеза, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: zhyldyza@bk.ru.
Камарли Айтакин Алий-Сааб, м.н.с., лаб. болезней домашних животных, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: aitakie27@mail.ru.

Abdyldayeva Roza Tynaybekovna, Junior Staff Scientist, Epizootology Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: roza.abdyldaeva.80@mail.ru.
Akmatova Elmira Kazakbayevna, Dr. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Head, Domestic Animal Diseases Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: akmatova_elmira@mail.ru.
Atambekova Zhyldyz Abdigaparovna, Junior Staff Scientist, Brucellosis Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: zhyldyza@bk.ru.
Kamarli Aytakin Aliy-Saab, Junior Staff Scientist, Domestic Animal Diseases Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: aitakie27@mail.ru.

Введение

Современное промышленное птицеводство позволяет на достаточно ограниченной территории содержать и выращивать большое поголовье птиц. Вместе с тем интенсификация производства продуктов птицеводстве требует неукоснительного выполнения норм санитарного состояния птичников. Однако особенности современного менеджмента зачастую связаны с переуплотнением птичьего поголовья на единицу площади, сокращением времени санитарных разрывов и перемешивания птиц разных возрастов. Технология разведения птиц, сопровождаемая «отдыхом» помещений, практически не используется. Подобное отступление от технологии, как правило, приводит к накоплению вирусной и бактериальной микрофлоры на территории птицеводческих хозяйств.

Наиболее распространенной инфекционной болезнью среди птиц является болезнь Ньюкасла. Летальность при данной инфекции очень высока, особенно среди молодняка. Продуктивность больной птицы снижается на 20-60%. К тому же данное заболевание требует значительных экономических средств на проведение мероприятий по оздоровлению и профилактике инфекций. Сложная эпизоотологическая ситуация по болезни Ньюкасла является серьезной преградой для обмена генетическим материалом сельскохозяйственной птицы [1].

На мировом уровне гибель молодняка птиц при вспышках БН и ГП может достигать 100%. В первом десятилетии XXI в. по данным ВОЗ официально зарегистрированы вспышки болезни Ньюкасла в 87 странах мира.

Болезнь Ньюкасла (псевдочума птиц) является наиболее разрушительной для домашней птицы и представляет постоянную угрозу. Вирус болезни Ньюкасла поражает огромное количество видов птиц [2]. Он передается перназальным или пероральным путем. Заболевание, вызываемое вирусом болезни Ньюкасла (ВБН), протекает с разной степенью интенсивности, а возбудитель имеет обширный круг хозяев [3]. Болезнь зарегистрирована на всех континентах мира, кроме Океании, и представляет реальную угрозу межгосударственной торговле птицей и продукцией птицеводства.

Болезнь Ньюкасла проявляется в поражении деятельности желудочно-кишечного тракта, дыхательной и центральной нервной системы, сопровождается резким снижением продуктивности и даже гибелью, достигающей 100%. Инкубационный период болезни Ньюкасла составляет 3-7 дн. Для больной птицы характерны малая подвижность, отсутствие реакции на внешние раздражители, вялость, потеря аппетита, повышение температуры.

Вирус болезни Ньюкасла (NDV) входит в состав птичьей группы парамиксовирусов (APMV), принадлежащей к роду Avulavirus, семейства Paramyxoviridae [4]. Род Morbillivirus представляет собой небольшую, антигенно-связанную группу внутри подсемейства Paramyxovirinae [5]. Подсемейство Paramyxovirinae выделено недавно и в него, кроме рода Morbillivirus, входят две группы вирусов: род Rubularvirus и род Paramyxovirus, ранее составлявшие один род Paramyxovirus. К рабулавирусам относятся

вирусы парагриппа человека типов 2, 4 и вирус болезни Ньюкасла [6].

Парамиксовирусы, выделенные от птиц, подразделяются на 9 серотипов, обозначенных как PMV 1-9. Вирус Ньюкасла относится к PMV-1 [2].

Вирус болезни Ньюкасла имеет оболочечный вирион плеоморфной формы, от 100-300 нм в диаметре. У вирусной оболочки есть способность сливаться с клеточными мембранами и вызывать сплавление инфицированных клеток. Все парамиксовирусы птиц имеют размер нуклеокапсидов около 18 нм в диаметре и высоту 5 нм, они свободно могут выходить из вирусных частиц [7].

Свойства генома. Геном NDV является линейной, одноцепочечной РНК, приблизительно $5x10^6$ дальтон молекулярной массы с отрицательной полярностью. Нуклеотидная последовательность генома NDV состоит из 15-156 нуклеотидов. Гены расположены в геномной РНК. Существует последовательность лидером на 3'-конце, которая состоит из 53 нуклеотидов, не трансформирующихся в белок. Имеются две консенсусные последовательности S и E, в начале и в конце каждого гена, которые, как полагают, инициируют сигнал транскрипции и полиаденилирования [5].

Вирус болезни Ньюкасла кодирует следующие белки генома: семь нуклеопротеинов (NP), фосфопротеин (P), V белок (B), матрицу (M), fijsion (F), гемагглютинин-нейраминидазу (EIN) и большие (L) белки [6]. Он отвечает за начальное прикрепление вирусных частиц к рецептору клетки-хозяина, содержащему у нейраминовую кислоту. Вирус быстро элюируется под действием нейраминидазы, даже при низких температурах (4єС).

Международным Эпизоотическим Бюро (МЭБ) болезнь Ньюкасла отнесена к особо опасным болезням, способным к быстрому распространению через государственные границы стран в глобальном масштабе [4].

Обнаружение все новых и новых вирусов, вызывающих инфекционные заболевания птиц, требует изменения подхода к мониторингу и их диагностике в промышленном птицеводстве.

Высокая эффективность мониторинга может быть достигнута только в том случае, когда методы диагностики доступны для региональных и производственных лабораторий и широко применяются в их практической работе. Несмотря на то, что традиционные иммунологические методы по-прежнему широко используются в ветеринарной практике, метод иммуноферментного анализа (ИФА) и метод ПЦР заняли ведущее место при проведении рутинных исследований. Преимущества ИФА и ПЦР, как методов диагностики, заключаются в скорости постановки реакции, чувствительности, специфичности, безопасности и возможности автоматизации процесса. Коммерческие наборы для ИФА и ПЦР нашли широкое применение в национальных программах борьбы с инфекционными болезнями птиц во многих странах Западной Европы и Америки [7].

В течение последнего десятилетия в промышленном птицеводстве были предприняты попытки модернизации антигенной диагностики с применением полимеразной цепной реакции. При постановке такой реакции для расчёта числа копий фрагмента нуклеиновых кислот была использована линейная зависимость логарифма титра (lgT) от величины логарифма S/P, отношения величины оптической плотности образца от количества копий фрагмента гена при ПЦР [8].

Полимеразная цепная реакция в реальном времени отличается высокой чувствительностью и специфичностью. В отличие от вирусологического метода за короткое время дает возможность получить достоверный результат. В реал-тайм ПЦР для обнаружения синтеза используют флюоресцирующие зонды.

Цель исследования – молекулярно-биологическая диагностика болезни Ньюкасл с применением ПЦР с обратной транскрипцией со специфическими праймерами.

Объекты и методы

Работа выполнялась в лаборатории вирусологии и биотехнологии научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Образцы патологического материала были получены в разгар эпизоотии в Кыргызской республике. Вскрывали вынужденно забитые трупы и павших цыплят, подозрительных на болезнь Ньюкасла (NDV), 2-4-месячного возраста из частного птицеводческого хозяйства. Для исследования были использованы ткани легких, печени, селезенки и трахеи. Образцы помещали в 50%-ный глицерин, при 20°С, до дальнейшего использования. Ткани легких подозрительных птиц массой 100 мг гомогенизировали и хранили в 1,0 мл фосфатно-буферного раствора pH 6,7-7, затем центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Для выделения РНК использовали RNeasy Mini Kit (50), Qiagen, реагенты для ПЦР Qiagen, буферы Promega, dNTP Amplisens. Обратную транскрипцию (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора Quanti Tect Reverse Transcription Kit Qiagen. Выделение РНК устанавливали в соответствии с протоколом (табл. 1).

Амплификацию осуществляли со специфическими праймерами болезни Ньюкасл (табл. 2).

Таблица 1

Приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР расчетом на один образец

Стоковые реактивы	Рабочая концентрация	Конечный объем расчета на 1 пробу (20 µl)
ddH_2O	-	7.2 µl
Buffer 5x	1 x	4 µl
dNTP mix 10x	0.2 x	0.4 µl
$MgCl_2$ 25 mM	1.5 mM	1.2 µl
Primer NP1 (NP3) (5 µM)	0.5 µM	2 µl
Primer NP2 (NP4) (5 µM)	0.5 µM	2 µl
Tag polymerase 5U/1 µl	0.2 U	0.2 µl
DNA 40 ng/ µl	120 ng	3 µl
Total	-	20 µl

Таблица 2

Последовательность праймеров

Праймеры	Олигонуклеотидная последовательность	Размер ПЦР продукта п.н.
Ny 1	5`-GCA-GCT-GCA-GGG-ATT-GTG-GT-3`	356 п.н.
Ny 1	5`-TCT-TTG-AGC-AGG-AGG-ATG-TTG-3`	

Температурно-временной режим каждого цикла ПЦР. Состоялась в следующем начальная денатурация при 94°С 40 с – 1 цикл, денатурация при 94°С – в течение 40 с, отжиг 52°С – в течение 45 с, элонгация 72°С – в течение 45 с. Все вместе ставилось на 36 циклов, завершающая элонгация 72°С в течение 5 мин. 1 цикл. Для детекции получения ПЦР продукта результаты считывали в 2%-ном агарозном геле в системе гельдокументирующей системе Gel Doc XR+, Bio-Rad. Размер ПЦР-продукта после амплификации 356 bp.

Результаты и их обсуждение

Интерпретацию результатов ПЦР на наличие вируса болезни Ньюкасла проводили по наработанным ПЦР продуктам, для сравнения ставили положительный контроль и маркер. В результате электрофореза получили соответствующие ПЦР продукты, указывающие на наличие возбудителя болезни Ньюкасла. Как показано на снимке, свечение ПЦР-продуктов отмечено на уровне 356 пар нуклеотидов относительно маркера и заранее известного положительного контроля (рис.).

Нами было проведено исследование 32 образцов патологического материала от павших и вынужденно забитых цыплят из различных птицеферм. Из 32 проб дали положительный результат 29 и 3 образца – отрицательный.

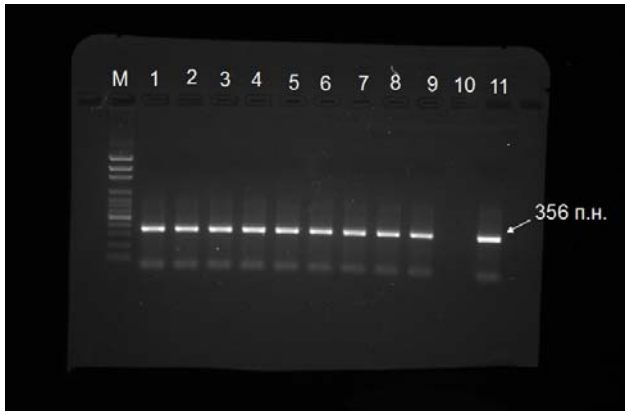

Рис. ПЦР-продукт 356 пар нуклеотидов: М – маркер; 1-9 – пробы; 10 – отрицательный контроль; 11 – положительный контроль

Заключение

Болезнь Ньюкасла – чрезвычайно опасное заразное заболевание. Оздоровительные мероприятия при ее появлении должны производиться с максимальной скоростью и в полном объеме, чтобы не допустить дальнейшего распространения вируса за пределы возникшего очага. Поэтому ранняя диагностика имеет исключительно важное значение. По установлению диагноза на неблагополучный пункт немедленно накладывается карантин с последующим оформлением его в установленном порядке.

В результате проведения ПЦР анализа были выявлены вирусные фрагменты болезни Ньюкасла в легких, печени, селезенке и трахее, что свидетельствует о высокой патогенности вируса и развитии инфекции в генерализованной форме.

Учитывая результаты исследований специфических фрагментов нуклеиновых кислот вируса болезни Ньюкасла, можно сделать вывод, что на данной птицеферме циркулировал вирус болезни Ньюкасла. Этому свидетельствует распространение вируса по всем жизненно важным органам больных птиц.

Актуальной задачей ветеринарной службы является разработка и внедрение в ветеринарную практику специализированных компьютерных программ для перевода оптической плотности в числовое значение точного количества копий гена и для автоматической обработки, хранения и создания баз данных.

Библиографический список

1. Апатенко В.М. Особо опасные вирусные инфекции сельскохозяйственных животных. – К.: Урожай, 1991. – 144 с.
2. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M, Bishop D.H.L. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Academic Press. – San Diego. – 2000. – P. 1024.
3. Бакулов И.А., Вологина И.В. Эпизоотическая ситуация по особо опасным болезням животных в 2007-2008 гг. // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию ВНИИВВиМ. – Покров. – 2008. – Т. 1. – С. 6-13.
4. OIE. Diseases of poultry: world trade and public health implications (monograph). Revue Scientifique et Technique, – Paris, OIE. – 2000. – P. 343-665.
5. Alexander D.J. Newcastle disease in ostriches (Struthio camelus) // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29. – P. 95-100.
6. Alexander D.J: Newcastle disease diagnosis London: Kluwer Academic Publishers. – 1988. – P. 147-160.
7. Horrox N. Countering immunosuppression. International Poultry Production. – 2000. – P. 8-12.
8. Biggs P.M. The world of poultry disease. Avian Pathology. – 1982. – P. 281-300.

References

1. Apatenko V.M. Osobo opasnye virusnye infektsii sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh. – K.: Urozhai, 1991. – 144 s.
2. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M, Bishop D.H.L. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Academic Press. – San Diego. – 2000. – P. 1024.
3. Bakulov I.A., Vologina I.V. Epizootich-eskaya situatsiya po osobo opasnym boleznyam zhivotnykh v 2007-2008 gg. // Problemy profilaktiki i bor'by s osobo opasnymi, ekzotiches-kimi i maloizuchennymi infektsionnymi boleznyami zhivotnykh. Mat. mezhd. nauchno-prakt. konf., posvyashch. 50-letiyu VNIIVViM. – Pokrov. – 2008. – T. 1. – S. 6-13.
4. OIE. Diseases of poultry: world trade and public health implications (monograph). Revue Scientifique et Technique. – Paris, OIE. – 2000. – P. 343-665.
5. Alexander D.J. Newcastle disease in ostriches (Struthio camelus) // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29. – P. 95-100.
6. Alexander D.J. Newcastle disease diagnosis London: Kluwer Academic Publishers. – 1988. – P. 147-160.
7. Horrox N. Countering immunosuppression. International Poultry Production. – 2000. – P. 8-12.
8. Biggs P.M. The world of poultry disease. Avian Pathology. – 1982. – P. 281-300.