

*Оторова А.А., Нургазиев Р.З., Орозов Ж.Ч.*

**КОЙДУН КУЛ ЫЛАҢЫНЫН ВИРУСУНУН ДНКСЫН КЫРГЫЗ  
РЕСПУБЛИКАСЫНДА АНЫКТОО**

*Оторова А.А., Нургазиев Р.З., Орозов Ж.Ч.*

**ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ И КОЗ В КЫРГЫЗСКОЙ  
РЕСПУБЛИКЕ**

*Otorova A.A., Nurgaziev R.Z., Orozov Zh.Ch.*

**IDENTIFICATION OF VARIOLA VIRUS DNA OF SHEEP AND GOATS  
IN THE KYRGYZ REPUBLIC**

УДК: 619:578.821.21

*Күл ылаңынын клиникалык белгилери менен ылаңданган койлордон алынган материалдарын молекулярдык биологиялык изилдөө иши жана тери жараларынан жана ички органдардан вирустун ДНК сы аныкталганы жазылган. Козулардын жана боос койлордун ылаңга тез кабылуусу аныкталган, андан тышкары колостралдык иммунитеттин инфекциядан сактабашы маалым болгон.*

*Было описано молекулярно-биологическое исследование материалов от больных овец с клиническими признаками оспы и выявлен ДНК вируса во внутренних органах и в кожных поражениях. Было установлено что наиболее уязвимыми являются суягные овцы и ягнята, также стало известно, что колостральный иммунитет не защищает ягнят от инфекции.*

**Ключевые слова.** *Геном вируса оспы овец, ДНК, изолят.*

*Described molecular biological research of materials from patients with clinical signs of sheep pox and viral DNA detected in the internal organs and skin lesions. It was found that the most vulnerable are of pregnant sheep and lambs, as it became known that colostral immunity does not protect lambs against infection.*

Оспа овец и коз является особо опасной инфекцией. Возбудителем оспы овец и коз являются ДНК-содержащие эпителиотропные вирусы, относящиеся к семейству Poxviridae, роду Capripoxvirus. Опасность болезни характеризуется высокой контагиозностью и летальностью, которая при доброкачественном течении составляет 5-10% и достигает 80-100% в случае осложнений при присоединении вторичных инфекций. Экономический ущерб, наносимый инфекцией складывается из гибели и выбраковки заболевшего поголовья мелкого рогатого скота и больших материальных затрат по отрасли на проведение охранно-карантинных и других мероприятий по ликвидации эпизоотии. Оспа овец и коз остается актуальным в мире заболеванием, Первые значительные эпизоотии болезни были отмечены в Англии в 1272 г. и во Франции в 1460 г. Подробно описали оспу овец Добантон, Тиссер (1777), а несколько позже – Гилберт (1798), указавший основные стадии формирования оспенной экзантемы. Болезнь широко распространена в Турции, Иране, Пакистане, Афганистане, Индии, Марокко, Алжире,

Тунисе, Ливии, Кувейте и многих других странах Азии и Африки. (Китай, 2002-2003; Монголия, 2006; Греция, 2007). Появление очагов оспы среди коз в различных странах мира (Турция, 2001; Таджикистан, 2001; Вьетнам, 2005) согласно решению МЭБ оспа овец и коз отнесена к группе А – быстро распространяющихся болезней животных.

Геном вируса оспы овец состоит из линейного ДНК, длина нуклеотиды - 150-160 кпн., с содержанием цитозин - гуанина (36%) и имеет конец с поперечно связанной петлей. Геном имеет в конце избыточную последовательность в обоих концах, и эта последовательность является многократной, инвертированной и конечной. Двунитевая ДНК ковалентно связана в обоих концах [1]. Сообщается, что геном вируса оспы овец закодировал 200 белков, расположенные с круга хозяев к иммунодоминантному белку P32, цитокину и комплементарному аналогу. Хотя, анализ рестрикции фермента (REA) выявляет взаимосвязь между сарпирох вирусами, это - один из ценных инструментов для группировки вируса оспы овец внутри разновидности происхождения, для дифференциации вакцинного и полевого штамма, чтобы изучать снижение иммунитета у вакцинированных животных, для выбора соответствующей вакцины и использование вакцин во время вспышки. Геномы сарпирох и orthorox вирусов отличаются как в последовательности так и в размере [3]. Изоляты вирус оспы овец и крупного рогатого скота имеют более близкую схожесть, чем вирусы коз, что основано нуклеотидном расхождении. Оспа овец и коз, дерматит крупного рогатого скота содержат копии предполагаемых G- связанных белков. Поскольку вакцинный вирус может действовать на многих животных и есть возможность рекомбинации из-за обширного использования вакцинного вируса, большое внимание уделяется изучению возможности передачи инфекции от одного вида животного к другому. Геном вируса оспы является большим и достаточно вирулентным в выражении многократных чужеродных генов и также полезным как вакцина. Так, изолят от кенийской овцы 1 (KS-1) был успешно использован как вектор для (i) клонирования 'F' гена вируса чумы крупного рогатого скота, который защищал крупный

рогатый скот не только против чумы но также и от дерматита, VP7 гена вируса блютанга (BTV) [2] и «Н» гена вируса чумы мелкого рогатого скота. Вирусы оспы овец и коз разделяют 96%-ую идентичность нуклеотида между собой, но они оба разделяют 97%-ое подобие с вирусом дерматита. Специфика носителя вируса зависит в значительной степени от определенного происхождения изолята или штамма вируса т.к., некоторые штаммы являются специфичными, в то время как другие показывают взаимную инфекционность к овцам и козлам. Вирус оспы овец и коз редко отличали в PCR путем определения гена P32 или с помощью мультиплексного PCR с использованием соответствующих праймеров [6]. Секвенирование и филогенетический анализ гена P32 и прикрепленного гена (A) показал, что вирусы рода *Sarpiroх* очень схожи в антигенном отношении, но отличаются на генетическом уровне.

Как видно из вышеизложенного литературного анализа, вирус оспы овец исследовано детально с применением более глубоких современных методов молекулярной биологии и вирусологии, т.е. изучена его морфология, физико-химические и молекулярно-биологические свойства. Но, вопросы изучения местных штаммов вируса оспы овец является актуальной проблемой современности.

#### Материалы и методы.

Ткани пораженных участков кожи и внутренних органов были взяты в Нарынской области. Для исследований в лаборатории из патологического материала готовили 30%-ную водную суспензию, которую осветляли центрифугированием.

Для выделения ДНК вируса оспы овец использовали наборы Axuprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit.

В нашей работе использовали праймер KS-1 с последовательностью GTGTGACTTTCCTGCCGAAT (1249-1268) и праймер KS-2 с последовательностью TCTATTTTATTTCTGATATC (1398-1417). Специфичность тест-систем определяется исключительно структурой праймеров. Как правило, для их создания используют уникальные и наиболее консервативные участки генома, в которых отсутствуют гомологии с какими-либо другими объектами. Основные характеристики праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1

#### Основные характеристики праймеров для ПЦР

праймер	Температура плавления, °С	Температура отжига, °С	Содержание G+C, %	Длина фрагмента, (п.н.)
KS-1.5	60	55	50	149
KS-1.6	60	55	55	

Анализ продуктов реакции проводили в 2% агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия, в 1х TBE при напряжении 100 В. В качестве

маркера использовали известный фрагмент длиной 149 п.н. или Набор фрагментов ДНК длиной 117, 224, 702, 1264, 1571, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454, полученный в результате рестрикции ДНК фага λ, по Eco 91. I. При просмотре геля в ультрафиолете наличие фрагмента размером около 149 н.п. свидетельствует о присутствии специфического фрагмента ДНК вируса оспы в исследуемой пробе.

**Результаты исследований.** В Нарынской области в феврале 2011 года в селе «Чет Нура» была зарегистрирована вспышка оспы овец. При анализе данных установлено, что причиной возникновения вспышки болезни овец явилась покупка 180 голов овец из разных районов Нарынской области, в том числе из Атбашинского района, где в 2010 году была вспышка оспы овец. Все купленные на скотном рынке овцы были привезены в село «Чет Нура» и без разрешения ветеринарного специалиста переместили на пастбища вместе с другими неинфицированными отарами овец. Всего пало от болезни 27 голов овец. По словам хозяина сначала у овец пропал аппетит, поднялась температура и затем на теле животных появились красные пятна. Затем наблюдалось отечность век сопровождающаяся истечениями из конъюнктивы глаз и носовой полости. После чего наблюдалось появление оспин, которые чаще всего высыпали в четкой форме на бесшерстных участках головы, внутренних частях конечностей хвоста и вымени. Эти папулы имели серо-белый или желтоватый цвет с плотными краями и красным ободком. Покрывающий их тонкий слой эпидермиса некротизировался и легко соскабливался. Болезнь протекала по разному и зависела в основном от возраста и состояния животного и длилась в течение 20-28 дней. Истощенные и слабые овцы, а также ягнята погибали от сепсиса и истощения.

С помощью ПЦР были исследованы суспензии из внутренних органов и пораженных участков кожи. (таблица 2).

Таблица 2. Результаты исследования в ПЦР 30% водной суспензии из паренхиматозных органов овец

Материал	Результаты		
	Паткартина	ПЦР I	ПЦР II
Легкие	типичная	?	+
Селезенка	типичная	+	+
Лимфоузлы	типичная	+	+
Соскобы кожи	типичная	+	+

**Примечание:** + положительный результат; ? сомнительный результат.

При исследовании селезенки, лимфатических узлов, легких и поражений кожи от животных также наблюдались явные патологические изменения, характерные для оспы.

При исследовании в ПЦР 30% водной суспензий от животных, фрагмент вирусной ДНК был выявлен в легких, селезенки, кожного покрова и

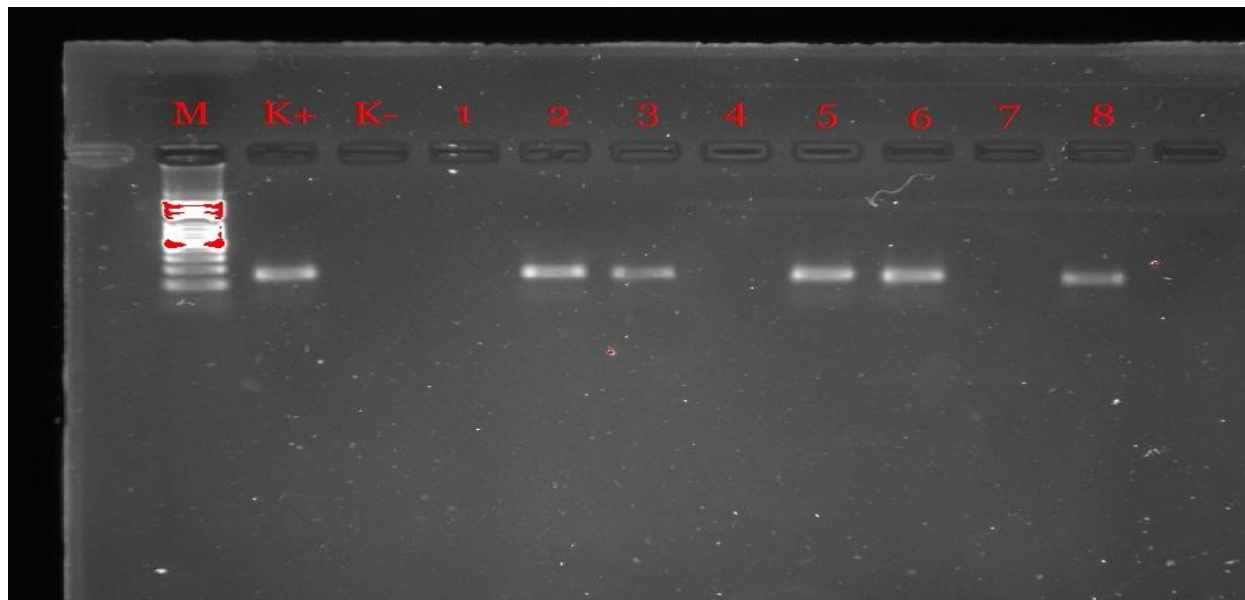
лимфатических узлах от животных с генерализованными патологическими изменениями органов.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии тропизма вируса для определенных органов, где могла наблюдаться ранняя инфекция оспы овец и коз, которая через несколько дней может привести к образованию и развитию клинической картины болезни.

Фрагмент амплифицированной ДНК длиной 149

н.п. обнаруживали визуально после электрофореза в 2% агарозном геле.

При использовании в ПЦР с другими разработанными парами праймеров не всегда удавалось избавиться от синтеза неспецифических фрагментов, поскольку матрицей в данном случае является клеточная ДНК. Наибольшую специфичность отмечали для KS-1 и KS-2, применение которой позволяет увеличить чувствительность метода.



**Электрофорез продуктов:** *M* - Маркер; *K+* - положительный контроль, *K-* - отрицательный контроль, *1* - отрицательный контроль (вода), *2* - легкое, *3* - селезенка, *4* - сердце, *5* - лимфоузлы, *6* - *7* - *8* - соскобы кожи.

Фрагмент амплифицированной ДНК длиной 149 н.п. обнаруживали визуально после электрофореза в 2% агарозном геле.

**Обсуждение.** Таким образом, проведенные нами исследования по воспроизведению ранее разработанного метода, оптимизации условий постановки ПЦР показали пригодность данного метода для выявления оспы овец. Определение первичной последовательности показало наличие последовательности, характерной для оспы овец и коз.

Дифференциация инфекций вызванными саргирох методом ПЦР на сегодняшний день является самым приемлемым и специфичным методом исследования. Ранее для ученых нашей республики этот метод не был возможным для использования, поэтому были использованы классические методы исследований, которые уступают по специфичности. На данном этапе после выявления ДНК вируса оспы овец нами поставлена задача изучить геном и определить родственную связь между другими, что целесообразно для изготовления эффективной вакцины.

У исследованных животных наиболее был поражен кожный покров, но ДНК вируса оспы овец и

коз выявили и во внутренних органах. После проявления клинических признаков животное было вскрыто на 4-й день, следовательно вирус обладает высокой вирулентностью. Наиболее уязвимыми являются ягнята 1-2 месячного возраста, которые не вакцинируются против оспы, такие животные быстро погибают. Колостральный иммунитет у ягнят, который должен был предотвращать заражение инфекцией не обеспечивает полную защиту. Суягные овцы также обладают низкой резистентностью на вирус оспы и у них болезнь протекает более тяжело. Из этого следует, что необходимо вакцинировать животных вакцинами из местного штамма, также необходимо вакцинировать овец за 3-4 месяца до родов, с учетом выработки вирусспецифических антител и передачей их новорожденным ягнятам.

#### Литература:

1. Afonso, C. L., E. R. Tulman, Z. Lu, L. Zsak, F. A. Osorio, C. Balinsky, G. F., Kutish, and D. L. Rock. 2002. The genome of swinepox virus. *J. Virol.* 76:783–790.
2. Yager J.A., Scott D.W., Wilcock B.P. The skin and appendages. In: *Pathology of Domestic Animals*, ed. Jubb KVF, Kennedy PC, and Palmer N, 4th ed., vol.1, pp. 628–644. Academic Press, San Diego, CA, 1993.
3. [Bhat PP](#), [Mishra BP](#), [Bhat PN](#). Identification and size variation of terminal fragments of sheep pox virus genome / *Indian J Exp Biol*. 1991 May;29(5):434-6.
4. [Cao JX](#), [Gershon PD](#), [Black DN](#). Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative

- gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue / [Virology](#). 1995 May 10;209(1):207-12.
5. Diallo A, Viljoen GJ. Genus capripoxvirus, p 167–181. In Mercer Schmidt A, Weber O (ed), Poxviruses. Birkhauser, Basel, Switzerland. 2007.
  6. Heine, H.G., M.P. Stevens, A.J. Foord and D.B. Boyle, 1999. A capripox virus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32 the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of Immunological Methods*, 227:187–196.
  7. Kitching RP, Carn V: Sheep pox and Goat pox. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE Paris; 2010, 1-12, [online]. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.14\\_S\\_POX\\_G\\_POX.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.14_S_POX_G_POX.pdf).
  8. [Orlova E.S.](#), [Shcherbakova A.V.](#), [Diev V.I.](#), [Zakharov V.M.](#) Differentiation of capripoxvirus species and strains by polymerase chain reaction. *Mol Biol (Mosk)*. 2006 Jan-Feb;40(1):158-64.
  9. Tulman E.R. et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.* 2002. 76:6054–6061

**Рецензент: д.б.н. Джапаралиев Н.Т.**

---