

Нургазиев Р.З., Нургазиева А.Р., Крутская Е.Д., Боронбаева А.И.

ЖАПАЙЫ КАНАТТУУЛАРДЫН НЬЮКАСЛ ЫЛАҢЫНЫН ВИРУСУН МОЛЕКУЛАЛЫК ГЕНЕТИКАЛЫК ЫКМАЛАР МЕНЕН БӨЛҮҮ

Нургазиев Р.З., Нургазиева А.Р., Крутская Е.Д., Боронбаева А.И.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ИЗ ДИКИХ И ПЕРЕЛЕТНЫХ ПТИЦ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

R.Z. Nurgaziev, A.R. Nurgazieva, E.D. Krutskaya, A.I. Boronbaeva

ISOLATION OF THE NEWCASTLE DISEASE VIRUS FROM WILD AND TRANSFER BIRDS BY THE MOLECULAR GENETIC METHOD

УДК: 619:578. 835.1

Бул илимий макала А.Дүйшеев атындагы ветеринардык илим-изилдөө институтунун вирусология жана биотехнология лабораториясында аткарылды. Патологиялык материал катары кекиртектен жана клоакадан алынган жуундуларды, мындан сырткары көк боордун, өпкөнүн, кекиртектин, ичегинин, боордун кесиндилери алынды. Илимий иштин максаты – Ньюкасл ылаңынын вирусун табуу, аны серологиялык жана молекулярдык биологиялык жактан изилдөө. Лабораториялык шартта Ньюкасл ылаңынын вирусун изилдөө жүргүзүлдү, вирусту топтоо үчүн тооктун эмбриону колдонулду. Молекулярдык биологиялык ыкма ПЧР жардамы менен реакцияны коюш үчүн, жумурткадан аллантоис суюктугу чогултулуп алынды. Изилдөөнүн жыйынтыгында, ПЧР ыкмасы менен изилденген 13 сынамыктын ичинен 9 сынамык оң жыйынтык берди. Мындан патогендүү вирустун бар экендиги билинди. Алынган маалыматтар мындан аркы филогенетикалык анализди жүргүзүү боюнча изилдөөлөрдө, вирустун штаммын аныктоодо жана идентификациялоодо колдонулат.

Негизги создор: Ньюкасл оорусу, полимераз чынжыр реакциясы, вирус, штамм, патологиялык материал, трахеидик мазоктору.

Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии научно-исследовательского института ветеринарии имени А.Дуйшеева. В качестве патологического материала отбирали клоакальные и трахеальные смывы, дополнительно отобрали кусочки органов (селезенка, легкие, трахея, кишечник, печень). Целью нашей работы являлось, выявить вирус болезни Ньюкасла, провести серологические и молекулярно биологические исследования. В лабораторных условиях, нами был проведен исследования вируса болезни Ньюкасла, для этого мы использовали куриные эмбрионы для накопления вируса. В дальнейшем из яиц собирали аллантоисную жидкость для постановки реакции при помощи молекулярно биологического методом полимеразно-цепной реакции. Результаты исследования показали следующие результаты. Из 13 проб исследованных методом ПЧР, 9 проб дали положительный результат. Из этого следует о наличии патогенного вируса. Полученные данные будут использоваться для дальнейших исследований по проведению филогенетического анализа, для идентификации и определения штамма вируса.

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, полимеразно-цепная реакция, вирус, штамм, патологический материал, трахеальные смывы.

Work carried out in the laboratory of Virology and Biotechnology Kyrgyz Research Institute of Veterinary named after A. Dyuysheeva veterinary medicine. As pathological material selected cloacal and tracheal swabs further selected bits of organs (spleen, lung, trachea, intestine, liver). Purpose to our work is to identify the virus Newcastle disease, to conduct serological and molecular biological research. The investigation of Newcastle disease has been carried out under laboratory conditions, we have to do this, we used chicken embryos to accumulate virus. Subsequently, the allantoic liquid was collected from the eggs for the reaction using a molecular biological method of PCR, which showed the following results. Results of the study showed the following results. Of the 13 samples examined by PCR, 9 samples gave a positive result. This implies the presence of a pathogenic virus. The obtained data will be used for carrying out further research on phylogenetic analysis, to identify and determine the strain of virus.

Key words: Newcastle disease, polymerase chain reaction, virus, strain, pathological material, tracheal swabs.

Введение. Наиболее часто в Кыргызстане встречаются такие инфекционные болезни птиц как: болезнь Ньюкасла, инфекционный ларинготрахеит, инфекционный бронхит и др.

Резервуаром возбудителей могут быть домашние утки, гуси, а также перелетные дикие птицы [1,2].

Болезнь Ньюкасла (НБ) является одним из наиболее распространенных вирусных болезней птиц которая влечет за собой огромные экономические потери птицеводству во всем мире [3].

Возбудитель РНК-вирус, принадлежащий к роду Avulavirus, семейства Paramyxoviridae [4,5]. Известно, что 241 вид из 27 отрядов семейства птиц чувствительны к вирусу болезни Ньюкасла [6,7]. Клинические признаки болезни Ньюкасла варьируются от тонких субклинических признаков до системной инфекции, которая может вызывать до 100% смертности [8,11].

Вирус можно выделить в паренхиматозных органах, костном и головном мозге, мышцах, трахеальной слизи, толстом и тонком кишечниках. В период клинической картины болезни, вирус выделяется во внешнюю среду с фекалиями, трахеальной слизью и выдыхаемым воздухом. Вирус, можно будет выделить, только в начале болезни. Переболевшие птицы могут долго быть вирусоносителем [9,10].

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в лаборатории вирусологии и биотехнологии с использованием серологических и молекулярно биологических методов.

Был взят патологический материал от убитых птиц. Фазан – 7, голуби – 5, дикие утки – 6, вороны – 4. (Рис. №1, 2, 3, 4) В качестве патологического материала отбирали клоакальные и трахеальные смывы, дополнительно отобрали кусочки органов (селезенка, легкие, трахея, кишечник, печень). Взятый патматериал был законсервирован в транспортную среду. Патологический материал отправили в лабораторию для дальнейших исследований.



Рис. 1. Трахеальные смывы голуби.



Рис. 2. Сбор патологического материала.



Рис. 3. Клоакальные смывы фазана.



Рис. 4. Трахеальные смывы утки.

Из органов готовили 10%-ную суспензию на физиологическом растворе. В ступке растирали навеску со стеклянной навеской для получения гомогенной массы. Добавить 9 мл физиологического раствора, содержащего 100 ЕД/мл тетрациклин и перенести во флакон.

Затем суспензию центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин. Выделение вируса осуществляли в куриных яйцах, не содержащих специфических патогенов, на основе стандартной процедуры.

Вирус болезни Ньюкасла выделяли коммерческим набором американского производства Axygen (AxyPrepTM Body Fluid, Viral DNA\RNA miniprepkit, cat. № AP-MN-BF-VNA-250) в соответствии с протоколом по его применению. Обратную транскрипцию (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора Quanti Tect Reverse Transcription Kit Qiagen.

Приготовление мастер микса для обратной транскрипции:

- Обратная транскриптаза -1 мкл;
- Буфер-4 мкл;
- Праймер микс-1 мкл;
- РНК-14 мкл;
- Инкубация 15 мин при 4 С

Амплификацию проводили со специфическими праймерами олигонуклеотида для имплификации 356 п.н. ампликонов, путем расщепления NDV-F гена вируса болезни Ньюкасла.

Полимеразная цепная реакция. Использовали 3 мкл выделенного РНК, 2 мкл gDNA Wipeout Buffer, 7х буфера и 9 мкл деионизированной воды. Инкубацию проводили в течение 2 мин при 42 °С.

Температурно-временной режим одного цикла ПЦР:

1. денатурация при 94 °С - 4 минуты,
2. денатурация при 94 °С в течение 40 секунд,
3. отжиг 52 °С в течение 45 секунд,
4. элонгация 72 °С в течение 45 секунд.

Всего проведено 36 циклов, заершающая элонгация 72°С в течение 5 минут. Для детекции полученного ПЦР-продукта результаты считывали в 2% агарозном геле в гель-документирующей системе

GelDocXR+, Bio-Rad. Размер ПЦР-продукта после амплификации составлял 356 п.н [4,21].

Идентификация специфических фрагментов РНК вируса Ньюкасла в исследуемых образцах, взятых от больных и подозрительных птиц, проводились с использованием ПЦР в классическом варианте.

Результаты исследования. Молекулярно-генетические исследования во многих странах показали гетерогенность циркулирующего вируса болезни Ньюкасла.

В лабораторных условиях, нами был проведен исследования болезни Ньюкасла при помощи полимеразной цепной реакции, который показал следующие результаты.

По результатам ПЦР анализа, указанным в таблице 1 видно, что в определённых пробах получен положительный результат, что говорит о наличии патогенного вируса.

Таблица 1

Результаты исследования ПЦР

Пробы	Праймер forward	Праймер reverse	Результаты
1	FHN1-F	FHN1-R	Полож
2	HN2-F	HN2-R	Полож
3	HN3-F	HN3-R	Полож
4	HNL4-F	HNL4-R	Полож
5	FHN1-F	FHN1-R	Полож
6	HN2-F	HN2-R	отр
7	HN3-F	HN3-R	отр
8	HNL4-F	HNL4-R	отр
9	FHN1-F	FHN1-R	полож
10	HN2-F	HN2-R	полож
11	HN3-F	HN3-R	полож
12	HNL4-F	HNL4-R	отр
13	FHN1-F	FHN1-R	полож

Заключение. Для диагностики и индикации вирусных болезней незаменимым оказался метод ПЦР, который открывает новые возможности повышения чувствительности и скорости обнаружения вирусов. По результатам наших исследований 9 проб из 13 показал положительный результат.

Филогенетический анализ выполнен для большого числа штаммов вируса болезни Ньюкасла и

определены основные генотипы, циркулирующие в различных частях мира, всего их 18. В Кыргызской Республике не проводились исследования по генетической вариабельности штаммов вируса болезни Ньюкасла среди диких и перелётных птиц. В последующих работах будет проводиться филогенетический анализ штамма вируса болезни Ньюкасла среди диких и перелетных птиц.

Литература:

1. Тротченко Н.В. Население птиц некоторых сельскохозяйственных угодий Чуйской долины. / Журнал «Наука и новые технологии», №2. - Бишкек, 2012.
2. Федорова С.Ж. Млекопитающие чуйской долины: современное состояние их биоразнообразия на территориях с различной степенью антропогенного воздействия. / Журнал «Наука и новые технологии», №4. - Б., 2013
3. Alexander DJ, Senne DA (2008) Avian paramyxoviruses 2–9. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (eds) Diseases of poultry, 12th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp 75-116.
4. Alexander DJ (1998) Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM (eds) A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 4th edn. American Association of Avian Pathologists, Athens, pp 156-163.
5. Kraneveld FC (1926) A poultry disease in the Dutch East Indies. Ned Indisch BI Diergeneeskde 38:448-450.
6. Alexander DJ (2006) Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM (eds) A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 4th edn. American Association of Avian Pathologists, Athens, pp 156-163.
7. Kaleta EF, Baldaus C (1988) Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander DJ (ed) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 197-246.
8. Грибанов, О.Г. Штаммовая дифференциация вируса Ньюкаслской болезни с помощью обратной транскрипции – ПЦР и секвенирования: смена популяций [Текст] / О.Г. Грибанов, Н.А. Перевозчикова, С.К. Старов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1999. - №1. - С. 23-27.
9. Скутарь И.Г. Проблемы борьбы с Ньюкаслской болезнью [Текст] / И.Г. Скутарь, В.Н. Сюрин // Ветеринария, 1981. - №12. - С. 32.
10. Резвых А. Ранняя диагностика ньюкаслской болезни [Текст] // Птицеводство. - 1983. - № 4. - С. 27-28.
11. OIE, 2009. Newcastle disease. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. Office International des Epizootics, Paris, pp. 576-589, Chapter 2.3.14.