

УДК578.2/578.5

АНАЛИЗ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ С ПОМОЩЬЮ ПЦР

*Смагина В.С., студентка 4 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии, valeriya.smagina@list.ru*
*Научный руководитель – Бурмакина Г.С., кандидат
биологических наук
ФГБНУ ФИЦВиМ*

Ключевые слова: *Полимеразная цепная реакция (ПЦР), геном, вирус геморрагической болезни кроликов (ВГБК), кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, электрофорез.*

Работа посвящена изучению методики выявления генома геморрагической болезни кроликов на примере фрагмента гена VP60 при помощи ПЦР.

Введение. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) - болезнь, характеризуется явлениями геморрагического диатеза во всех органах, в особенности в легких и печени. Болезнь высоко контагиозна и очень быстро распространяется среди взрослого поголовья домашних и диких кроликов. Сведений о восприимчивости к вирусу животных других видов и человека нет. При ВГБК заболеваемость достигает 70-80%, а летальность – 90-100%[4].

Впервые вспышка болезни была зарегистрирована в Китае в 1984г. где и получила самое широкое распространение. За несколько лет заболевание распространилось по всему миру. В последние годы вспышки регистрировались в 30 странах мира, включая многие страны Европы, в России, США, Уругвае, Египте, КНР, Австралии и другие.

В России впервые болезнь среди кроликов появилась в 1986 году на Дальнем Востоке в пограничном с Китаем совхозе «Дальневосточный». Оттуда болезнь начала распространяться по Московской области и другим регионам России. К 1987 году болезнью был поражен 31 регион страны. Остановить вспышку удалось благодаря разработанной в 1987 г. во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ (ныне ФГБНУ ФИЦВиМ) г. Покров) вакцине против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой. К

1996 г. регистрация болезни в Россия прекратилась[7].

С 2000 г. на территории России начала формироваться новая волна ВГБК, приводя к опустошению кролиководческих хозяйств многих районов. В 2003г. ВГБК появилась уже в 13 областях Европейской и Азиатской частей России. С 2005 по 2009 год вспышки регистрировались в Московской, Владимирской, Тульской, Астраханской, Иркутской и других областях. Характерной особенностью современной волны распространения ВГБК является то, что вспышки болезни, обнаруживают даже в хозяйствах, где кроликов постоянно прививают против ВГБК. Уровень гибели находится в пределах 60-66%[5].

Высокая контагиозность и смертность кроликов при данной вирусной инфекции обуславливает необходимость разработки экспресс методов диагностики ВГБК с целью быстрого и своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий.

Целью данной работы являлось изучение методики выявления генома вируса геморрагическая болезнь кроликов с помощью ПЦР.

Задачи. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Рассмотреть методику выявления генома вируса геморрагической болезни кроликов;
2. Постановка полимеразной цепной реакции.

Ход работы. Штаммы вируса ГБК были получены из коллекции музея вирусных штаммов ФГБНУ ФИЦФим (Покров). РНК выделяли с использованием гуанидинового лизирующего буфера при последующем применении нуклеосорбента. Праймеры подбирали на основе анализа нуклеотидных последовательностей вируса ГБК, имеющихся в базе данных GeneBank. ПЦР и кДНК синтезировали с использованием подобранных специфических праймеров.

**Таблица 1 - Реакционная смесь для ПЦР
объемом 25 мкл**

Компонент	Количество
PCR mix	14,65 мкл
Primers	5 мкл
Ревертаза	0,2 мкл
Полимераза	0,15 мкл
РНК-матрица	мкл

Аmplификацию специфического участка проводили на детектирующем амплификаторе «DTprime» фирмы «ДНК-Технология», включающие несколько циклов амплификации, при следующем режиме:

Таблица 2 - Программа амплификации

1. 37,0 °C - 15:00
95,0 °C - 05:00
2. 95,0 °C - 00:15
55,0 °C - 00:15
72,0 °C - 00:15

Результаты ПЦР учитывали путем анализа продуктов амплификации методом электрофореза в 2%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

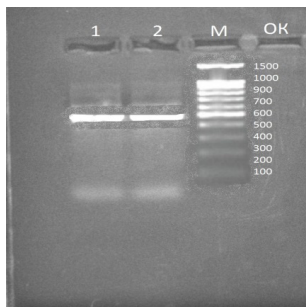


Рисунок 1 - Электрофореграмма амплифицированной кДНК вируса геморрагической болезни кроликов (1 – первая проба, 2 – вторая проба, М – маркер, ОК – отрицательный контроль)

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали нам, что данный метод выявления является пригодным по отношению к геному вируса геморрагической болезни кроликов. Из результатов исследований видно, что с помощью метода ПЦР удалось выявить специфический фрагмент кДНК геморрагической болезни кроликов. Как и ожидалось в отрицательном контроле специфический фрагмент не выявлен.

Библиографический список

1. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов / И.Л. Шевченко А.А., Вишняков И.Ф., Бакулов И.А., Власова Т.А. М.: Две Короны, 1996;22-23с.
2. Методические указания по лабораторной диагностике вирусной геморрагической болезни кроликов. // Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины. Лабораторные методы исследований инфекционных патологий животных. Ч. 4. - М: Мир, 2008;35с
3. Asgari S., Hardy J. R., Cooke B. D. Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: alterations after its release. // Arch Virol, 1999;17с.
4. Forrester N.J., Boag B., Moss S.R., Turner S.L., Trout R.C., Gould E.A. Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. // Journal of General Virology, 2003, №84;50-51с.
5. Moss S.R., Turner S.L., Trout R.C., White P.J., Hudson P.J., Desai A., Armesto M., Forrester N.L., Gould E.A. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus // J. Gen. Virol., 2002; 83: 2461—2467с.
6. Tian L., Liao J., Li J., Zhou W., Zhang X., Wang H. Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 Gene // Virus Genes, 2007; 35: 745—752с.
7. <https://vetvo.ru/virusnaya-gemorragicheskaya-bolezn-krolikov.html>

HEMORRHAGIC DISEASE OF RABBITS USING PCR

Smagina V. S.,Burmakina G.S.

Key words: *Polymerase chain reaction (PCR), genome, rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), cDNA complementary deoxyribonucleic acid, electrophoresis.*

The work is devoted to the study of the method of detection of the genome of rabbit haemorrhagic disease on the example of a fragment of the VP60 gene using PCR.