

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

ИНДИКАЦИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КОМБИКОРМЕ МЕТОДОМ ГНЕЗДОВОЙ ПЦР РВ

Карсакова М.А., 5 курса факультета ветеринарной медицины
Кудряшов Д.А., аспирант ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии
Научный руководитель: к.б.н. зав. лаб. Газаев И.Х.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: АЧС, комбикорм, пробоподготовка, гнездовая ПЦР РВ.

Африканская чума свиней (АЧС) – распространяющаяся разрушительная вирусная болезнь, которая в настоящее время угрожает разведению свиней в России и во всем мире. Это одна из самых серьезных болезней животных, поскольку вызывает высокую смертность среди свиней, социально-экономические последствия и имеет склонность к быстрому и непредвиденному распространению. АЧС относится к группе трансграничных инфекций животных, определенных ФАО как болезни, которые оказывают существенное влияние на экономику, торговлю и продовольственную безопасность значительного количества стран, могут легко распространиться из одной страны в другую и достигать эпидемических масштабов.

Возможен занос заболевания с инфицированными кормами. Что подразумевает использование для кормления свиней не прошедших термическую обработку пищевых и боенских отходов, контаминированных вирусом [2].

Также, источником заражения может служить комбикорм, не прошедший ветеринарно-санитарную экспертизу и поступающий из районов, неблагополучных по АЧС [1].

Перевозка комбикорма в транспортных средствах, не подвергшихся ветеринарно-санитарной обработке, хранение в помещениях, инфицированных возбудителем, также может привести к попаданию в него вируса и, как следствие, заражению свиней.

Таким образом, поставка комбикорма, контаминированного вирусом АЧС, в благополучные по инфекции регионы, представляет серьезную угрозу для свиноводческих хозяйств как промышленного, так и частного секторов.

Цель исследования: Целью исследования являлась отработка методов отбора, подготовки проб комбикорма и индикация генома вируса африканской чумы свиней с помощью гнездовой ПЦР.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали:

- кровь от свиньи, экспериментально заражённой вирусом АЧС штамм «Ставрополь 2009» (инфекционный титр $5,0 \lg \text{ГAE}_{50/\text{cm}^3}$);

- комбикорм для свиней, в состав которого входят: отруби пшеничные, ячмень 2 класса, мучка ячменная, мел кормовой, жмых подсолнечный, премикс КС-1.

Контаминация комбикорма. Готовили навески комбикорма (5 шт.) массой 300 г каждая. Затем навески контаминировали вирусосодержащей кровью свиней в 10х разведениях по 30 см³ на каждую навеску комбикорма. Использовали вирусосодержащую кровь с различным инфекционным титром вируса (табл. 1).

Таблица 1 – Инфекционный титр вируса АЧС в крови, использованной для контаминации комбикорма

| № пробы комбикорма | Инфекционный титр вируса |
|--------------------|---|
| № 1 | 5,0 lgГAE _{50/см} ³ |
| № 2 | 4,0 lgГAE _{50/см} ³ |
| № 3 | 3,0 lgГAE _{50/см} ³ |
| № 4 | 2,0 lgГAE _{50/см} ³ |
| №5 | 1,0 lgГAE _{50/см} ³ |

Комбикорм тщательно перемешивали для равномерного распределения крови по всей массе и оставляли высушиваться в течение 12 часов при комнатной температуре.

Пробоподготовка. Для элюции вируса, в комбикорм добавляли стерильный физиологический раствор в соотношении 1:5 (вес/объем), перемешивали в течение 5-10 минут при комнатной температуре.

Суспензию фильтровали через 8 слоев стерильной марли. Пробы однократно замораживали при температуре минус 60⁰С в течение 8 часов. После полного оттаивания при комнатной температуре пробы осветляли низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Полученный супернатант фильтровали с помощью прибора вакуумного фильтрования через мембранный фильтр с диаметром пор 450 мкм (ФМНЦ-0,45). Выбор диаметра мембранного фильтра был сделан на основании результатов, полученных Lucas A., et al [6] в опытах по фильтрованию крови и сыворотки через фильтры Шамберлана, Беркефельда и Зейтца с разным диаметром пор (300, 450, 500, 1000 мкм). Авторами было установлено наличие вируса в фильтрах с диаметром пор 300 и 450 мкм, и отсутствие его в фильтрах с диаметром пор 500 и 1000 мкм [3].

На следующем этапе пробоподготовки в стерильной фарфоровой чашке фильтры измельчали со стерильным стеклом; добавляли 0,2 см³ деионизированной воды и 1,0 см³ лизирующего буфера. Полученную жидкость отбирали в чистые пробирки объемом 1,5 см³, центрифугировали при 13400 об/мин в течение 30 секунд. Супернатант использовали для выделения НК.

Пробы комбикорма прошли все этапы пробоподготовки: приготовление суспензии, фильтрование через марлю, замораживание-оттаивание,

центрифугирование, фильтрование через мембранный фильтр, получение супернатанта для дальнейшего выделения НК.

Выделение НК. Выделение ДНК проводили по модифицированной методике Boom et al.[11]

Постановка гнездовой ПЦР-РВ. Постановку гнездовой ПЦР-РВ осуществляли в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией по применению и разработанными ранее протоколами.[5]

Учёт результатов реакции проводили, анализируя кривые накопления флуоресцентного сигнала, с помощью программного обеспечения используемого амплификатора.

Результаты и обсуждение

Для постановки гнездовой полимеразной цепной реакции в реальном времени были отобраны пробы комбикорма, которые мы искусственно контаминировали, провели пробоподготовку комбикорма, а далее проводили выделение генетического материала вируса АЧС методом нуклеосорбции.

Постановку гнездовой ПЦР-РВ осуществляли с помощью двух раундов. Первый раунд (преамплификация) состоял из подготовки реакционной смеси, в которую входил ПЦР буфер RT- 8 мкл, Primer mix-1 мкл, ДНК полимеразы- 0,1 и проводился на приборе Palm-Cycler фирмы Corbett Research при следующих температурных режимах: первый цикл - денатурация при 94° 3 мин, затем 25 циклов (денатурация-94° 10сек, отжиг 58° 30сек и синтез при 72° 15сек). Второй раунд с последующим учетом и интерпретацией результатов проводили по анализу кривых накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM.[4]

При постановке ПЦР-РВ на матрицах ДНК, выделенных из проб комбикорма № 1, № 2, № 3, № 4 и № 5 положительный результат регистрировали в образцах № 1, № 2 и № 3 (рис. 1).

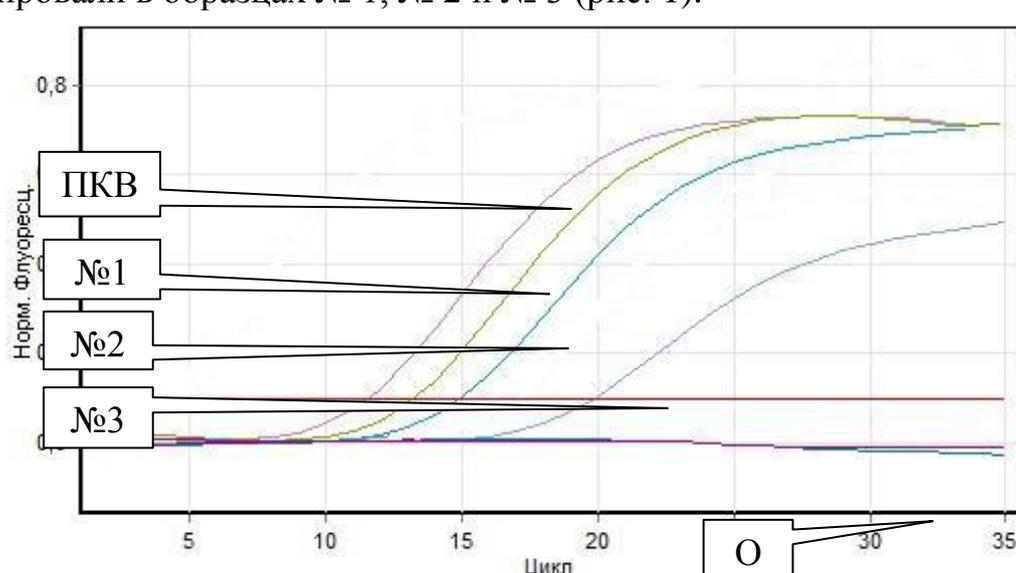


Рис. 1. График накопления флуоресцентного сигнала в процессе гнездовой ПЦР-РВ, построенный при исследовании образцов комбикорма

Значения порогового цикла, зарегистрированные при исследовании проб комбикорма № 1, 2, 3, находились в прямой зависимости от величины инфекционного титра вируса в образцах.

Таким образом, при исследовании комбикорма на наличие генома вируса АЧС с помощью гнездовой ПЦР-РВ рекомендуется включать в диагностическую схему стадию пробоподготовки данного материала, состоящую из этапов приготовления суспензии, фильтрования через марлю, замораживания-оттаивания, низкоскоростного центрифугирования и фильтрования через фильтры с диаметром пор 450 мкм. Установлено, что в подготовленных данным способом образцах комбикорма, ДНК вируса АЧС выявляли при титре от $3,0 \lg \text{ГAE}_{50/\text{см}^3}$ и выше с использованием гнездовой ПЦР РВ.

Выводы

Проведение полного цикла пробоподготовки комбикорма позволяет получить очищенный от примесей и сконцентрированный материал, который может быть использован для дальнейших исследований на наличие ДНК вируса АЧС с помощью ПЦР-РВ.

При включении данной процедуры в классическую схему индикации генома вируса АЧС на основе ПЦР-РВ в образцах комбикорма искомый фрагмент ДНК можно выявлять в пробах с титром вируса не менее $3,0 \lg \text{ГAE}_{50/\text{см}^3}$.

Библиографический список

1. Атражева Т. Ветеринарно-санитарная оценка комбикормов, используемых в кормлении свиней. // В кн.: Пути повышения качества продуктов животноводства и их ветеринарно-санитарная оценка / Т. Атражева. - Киев, -1981. – С. 41.
2. Бакулов, И.А. Африканская чума свиней / И.А. Бакулов. – М.: Колос, 1969. - С. 267-290.
3. Козлова Д.И., Бесхлебнов В.А. Современные проблемы Африканской чумы свиней / Д.И. Козлова, В.А. Бесхлебнова.- 1980. – с. 15 – 18.
4. Применение метода ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса африканской чумы свиней / И.Х. Газаев, А.А. Елсукова, И.П. Синдрякова, С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов // МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2010: 7 Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием.- М., 2010.- С. 83-85.
5. Detection of ASFV by nested real-time PCR/ Gazaev I. H., Elsukova A.A., Kalabekov I.M., Tsybanov S.Zh. Epizon 2011. P. 181.
6. Lucas, A. Classification of african swine fever virus / A. Lucas, R. Carnero, M. Bresso / C. R. Acad. Sci. – 1968. - Vol. 266, № 17. - P. 1800-1801.
7. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans [et.al.] // J. Clin. Microbiol. - 1990. - Vol. 28, № 3. - P. 495-503.

INDICATION OF THE GENOME OF THE VIRUS OF AFRICAN SWINE FEVER IN THE FEED USING NESTED-PCR RV

Karsakova M.A., Kudryashov D.A., Gazaev I.H.

Keywords: ASF, mixed fodder, sample preparation , nested-PCR RV.

African swine fever (ASF) - distributed devastating viral disease that currently threatens the pigs all over the world. This is one of the most serious animal diseases as causes of high mortality among pigs, socio-economic impacts, and has a tendency to rapid and unexpected spread. The disease belongs to the group of transboundary animal infections defined by FAO as diseases that have a significant impact on the economy, trade and food security of a significant number of countries, can easily spread from one country to another and reach epidemic proportions.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Дубровская О.А., 5 курс факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель: к.б.н., м.н.с. Казакова А.С.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), рекомбинантный белок р30, иммуноблоттинг, тест-система.

В статье описано определение диагностической чувствительности и специфичности тест-системы для экспресс-диагностики африканской чумы свиней (АЧС) путем выявления вирусспецифических антител методом иммуноблоттинга с использованием нитроцеллюлозных иммунострипов с иммобилизированным на них полипептидом рекомбинантного белка р30.

Африканская чума свиней (АЧС) – экономически значимая болезнь, характеризующаяся лихорадкой, кровоизлияниями и отеками, неоднозначно выраженными при различных формах ее течения, начиная от сверхострой, со 100% гибелью животных, до субклинической [16, 3]. Домашние свиньи и дикие кабаны восприимчивы к болезни, а бородавочники и кустарниковые свиньи являются пожизненными вирусоносителями АЧС [3, 4].

Возбудитель АЧС – цитоплазматический ДНК- содержащий вирус, который в 2000 г. был отнесен к семейству Asfarviridae [12].

С 2007 г. по 2014 г. зарегистрировано 656 вспышек в 36 регионах Российской Федерации (РФ), пали и были вынужденно убиты более 900 тыс. свиней [8]. Болезнь регистрировалась в Грузии, Армении Азербайджане, Иране. В 2012-2014 гг. отмечены заносы АЧС в Белоруссию и Украину из РФ, в 2014 г. – в Литву и Польшу из Белоруссии [1, 2, 7, 9, 10].

В связи с особенностями биологических свойств возбудителя эффективные средства специфической профилактики против АЧС не разработаны, поэтому быстрая лабораторная диагностика имеет решающее значение в борьбе с болезнью [6]. Стратегия борьбы с распространением вируса