Научная статья

УДК 577.212.3:578.222

Разработка ПЦР-анализа в режиме реального времени для диагностики инфекционной анемии цыплят

Константин Юрьевич Дмитриев, Анна Николаевна Семина

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»)

Аннотация: *Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) является значимой проблемой для всех стран с развитым промышленным птицеводством. Широкое распространение вируса ИАЦ, оказывающего иммунодепрессивное воздействие на организм цыплят вследствие поражения лимфоидных органов, повышение рисков возникновения вторичных инфекций различной этиологии, снижение эффективности проведения специфической профилактики, показателей сохранности и продуктивности являются причиной значительного экономического ущерба. Выделение и идентификация возбудителя ИАЦ с использованием вирусологических методов затруднена, поэтому диагностика болезни молекулярно-биологическими методами является актуальной и перспективной. Приведены данные о разработке высокочувствительного и специфичного анализа на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для выявления генома вируса ИАЦ. В результате исследований были подобраны образцы праймеров к перекрывающейся консервативной области генома VP2-VP3, установлена их специфичность и чувствительность, а также оптимизированы условия проведения реакции. Полученные в ходе исследований результаты свидетельствуют о том, что использование данных праймеров позволяет с высокой точностью выявлять геном вируса ИАЦ, что существенно улучшает возможности диагностики данной инфекции на ранних этапах, а также при субклиническом и ассоциированном течении болезни.*

Ключевые слова: *инфекционная анемия цыплят, вирус, диагностика, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ДНК.*

Для цитирования: *Дмитриев, К.Ю. Разработка ПЦР-анализа в режиме реального времени для диагностики инфекционной анемии цыплят / К.Ю. Дмитриев, А.Н. Семина // Птицеводство. – 2025. – №9. – С. 66-70.*
doi: 10.33845/0033-3239-2025-74-9-66-70

Введение. Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) характеризуется развитием тяжелой анемии, кровоизлияниями, лимфоидной атрофией, задержкой роста и развития, повышением смертности молодняка и нарастающей иммуносупрессией. Основные клинические признаки наблюдаются у молодняка в возрасте 2-5 недель, у птицы более старших возрастов клинические симптомы не выражены. Передача возбудителя осуществляется горизонтальным и вертикальным путем [1-3].

Снижение количества и качества получаемой продукции, дополнительные затраты на лечебно-профилактические мероприятия, направленные на борьбу с возникающими на фоне иммуносупрессии вторичными инфекциями, снижение эффективности последующих вакцинаций и общее повышение себестоимости продукции являются основными критериями, формирующими экономические потери от ИАЦ [4-6].

Вирус ИАЦ является одним из самых маленьких безоболочечных ДНК-вирусов, принадлежащих к семейству *Anelloviridae*. Его размер составляет около 19-25 нм. Геном представлен кольцевой одноцепочечной антисмысловой ДНК длиной около 2,3 кб. В своей структуре геном вируса ИАЦ имеет три открытых рамки считывания (ORF), которыми кодируются основные вирусные протеины – VP1, VP2, VP3 [7,8].

VP1 является основным структурным белком массой 51,6 кДа, отвечающим за сборку вирусных частиц и формирование капсида вируса, благодаря ДНК-связывающей активности. VP1 вовлечен в процесс прикрепления вируса к клетке, а также, за счет специализированных эпитопов, способен взаимодействовать с вируснейтрализующими антителами [9].

Конформационный белок VP2 массой 24 кДа является многофункциональным, он принимает участие в репликации вируса, вовлечен в процесс взаимодействия с вируснейтрализующими антите-

Таблица 1. Структура праймеров и зонда для амплификации фрагмента ДНК вируса ИАЦ в ПЦР-РВ

Определяемый вид	Название праймера	Последовательность	Размер ампликона, п.н.
ИАЦ	CAV-F630	ACGCTAAGATCTGCAACTG	127
	CAV-R 756	TTACCCTGTACTCGGAGG	
	CAF Z	CAAGCCTCCCTCGAAGAAGC	

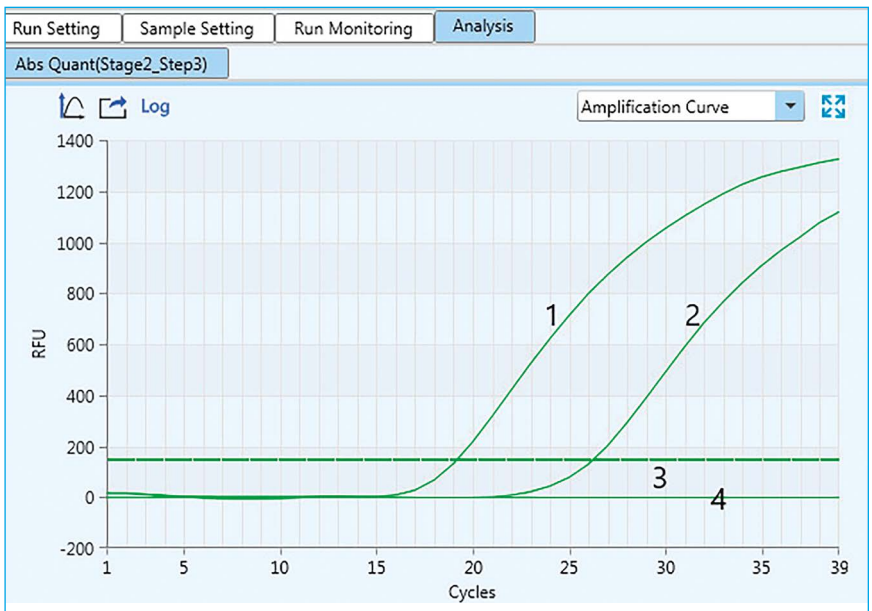

Рис. 1. Графическое изображение выявления генома CAV в ПЦР РВ: 1, 2 – штамм 26P4 (Nobilis® CAV P4); 3 – геном других вирусов; 4 – отрицательный контроль

лами и обладает антигенной активностью [10].

Белок VP3 (апоптин) считается ключевым в патогенезе ИАЦ. Так, вызывая апоптоз в клетках-мишенях (тимоциты и клетки костного мозга), он обеспечивает высвобождение вируса из клеток и инфицирование новых, а также развитие анемии и иммуносупрессии [11,12].

Для максимального снижения рисков возникновения вспышек данной инфекции стоит уделять особое внимание мерам, направленным на повышение биобезопасности, включая совершенствование средств диагностики и контроля данной инфекции [13,14].

Для лабораторной диагностики ИАЦ в настоящее время используют реакцию нейтрализации (РН), иммуноферментный анализ (ИФА) и классическую полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Но все они уступают ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) по чувствительности, специфичности и скорости постановки. ПЦР-РВ является отличным инструментом для диагностики сложных инфекций на ранних этапах их течения, т.к. основывается на выявлении непосредственно генетического материала возбудителя и не зависит от выработки специфических антител.

Материал и методика исследований. Для первоначального проектирования праймеров для ПЦР-РВ использовался полный геном изолята вируса ИАЦ LN1401 (KU641013.1), полученный в базе данных GenBank (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). В качестве целевого участка для подбора праймеров была выбрана консервативная перекрывающаяся область гена VP2-VP3.

Подбор перспективных праймеров производился с помощью программного обеспечения GeneRunner 6.5. Анализ CG-состава (%), температур плавления (Tm), образование шпилек, димеров и прочих вторичных структур производился с помощью программного обеспечения GeneRunner 6.5 и Oligo Analyzer Tool (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer). Анализ возможности неспецифической гибридизации праймеров проведен с использованием алгоритма BLAST по базе данных GenBank (NCBI). Отобранные последовательности праймеров приведены в табл. 1. Наборы праймеров были синтезированы в компании Beagle (Санкт-Петербург).

ПЦР-РВ проводили с использованием амплификаторов BioRad CFX96 (США) и Locus® Intero (Китай). Были подобраны оптимальные температурно-временные условия проведения реакции.

Реакция проводилась в объеме 25 мкл, который включал в себя 15 мкл реакционной смеси для ОТ-ПЦР-РВ, по 1 мкл прямого и обратного праймера в концентрации 10 пмоль, 0,5 мкл зонда в концентрации 10 пмоль, 5 мкл исследуемой пробы и 2,5 мкл воды, свободной от нуклеаз. В каждой серии исследований, помимо исследуемых образцов, использовались положительные и отрицательные контрольные образцы. Учет реакции производился с помощью анализа графиков накопления флуоресцентного сигнала.

Определение порога чувствительности производилось серией последовательных 10-кратных разведений исследуемой ДНК с последующей постановкой ПЦР-РВ для каждого отдельного разведения в 3 повторностях.

Специфичность разработанных праймеров оценивали с помощью смежной амплификации исследуемой ДНК и ДНК вирусов

инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур и ньюкаслской болезни.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследований по выявлению генома вируса ИАЦ производились по показателям эффективности, специфичности, чувствительности и воспроизводимости.

Для анализа специфичности использовали вакцинный штамм 26Р4 (Nobilis® CAV P4), который давал положительную реакцию, регистрируемую в форме экспоненциальной кривой с подъемом и выходом на плато на 16-19 цикле амплификации. Кроме того, не было обнаружено никакой специфической реакции с гетеро- и гомогенными вирусными агентами птиц (рис. 1).

Чувствительность разрабатываемого анализа оценивали путем исследования серии 10-кратных последовательных разведений исходного вируса (от 10^{-1} до 10^{-8}). Результаты показали, что анализ выявляет геном вируса ИАЦ до разведения 10^{-7} (рис. 2).

Чтобы оценить воспроизводимость результатов, за один проход производили анализ 3 отдельных серий разведений для выявления вариаций внутри анализа.

Заключение. ИАЦ была и остается актуальной проблемой птицеводческой отрасли сельского хозяйства. Особенности течения болезни, совокупность вызываемых поражений, затрагивающих кроветворные и лимфоидные органы и ткани, иммуносупресия, а также нередко ассоциированное течение с другими болезнями являются комплексом факторов, которые существенно осложняют специфическую профилактику и диагностику данной инфекции. В промышленном птицеводстве, где на ограниченной территории содержится огромное поголовье птиц, где интенсивность производства продукции очень высока, ценность высокоэффективных средств для проведения мониторинговых и диагностических исследований многократно возрастает. Классические методы диагностики все так же могут успешно выполнять свою функцию, но в виду своей трудоемкости и длительности они значительно уступают молекулярно-биологическим методам. Разработка ПЦР-РВ-анализа для диагностики ИАЦ позволит в короткие сроки с высокой достоверностью и низкими материальными затратами выделить и идентифицировать возбудителя и своевременно принять меры к снижению потерь от болезни.

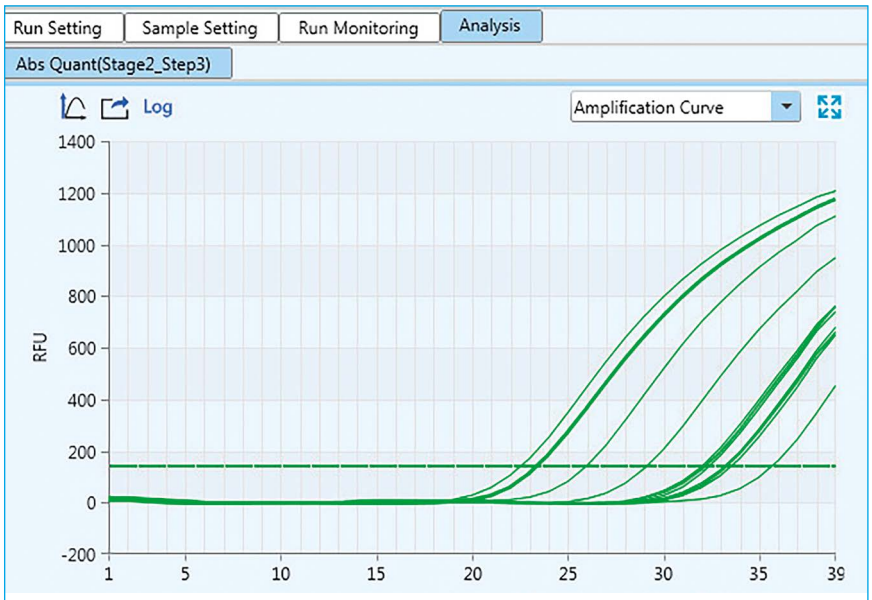

Рис. 2. Анализ чувствительности ПЦР-РВ: кривые амплификации последовательных 10-кратных разведений ДНК штамма 26Р4 (Nobilis® CAV P4)

Исследования выполнены в рамках выполнения темы государственного задания №1024041200040-4-4.3.1.

Литература / References

1. Hagood, L.T. Evaluation of chicken infectious anemia virus and associated risk factors with disease and production losses in broilers / L.T. Hagood, T.F. Kelly, J.C. Wright, F.J. Hoerr // Avian Dis. - 2000. - V. 44. - No 4. - P. 803-808. doi: 10.2307/1593052
2. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят и качество мяса бройлеров / М.Е. Дмитриева // Птица и птицепродукты. - 2016. - №4. - С. 48-49. [Dmitrieva ME (2016) Chicken infectious anemia and quality of broiler meat. *Poult. Chicken Prod.*, (4): 48-9 (in Russ.)]
3. Dhama, K. Chicken infectious anemia virus: an immunosuppressive pathogen of poultry – a review / K. Dhama, M. Mahendran, R. Somvanshi, M.M. Chawak // Indian J. Vet. Pathol. - 2008. - V. 32. - No 2. - P. 158-167.
4. Bhatt, P. Prevalence of chicken infectious anaemia virus (CIAV) in commercial poultry flocks of Northern India: a serological survey / P. Bhatt, S.K. Shukla, M. Mahendran, K. Dhama, M.M. Chawak, J.M. Kataria // Transbound Emerg. Dis. - 2011. - V. 58. - No 5. - P. 458-460. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01215.x

5. Абгарян, С.Р. Молекулярно-биологические методы диагностики болезней птиц / С.Р. Абгарян // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики: Мат. Междунар. науч.-практ. конф., посв. 100-летию со дня рожд. проф. В.В. Рудакова, СПб, 25-26 мая 2023 г. - Санкт-Петербургский гос. ун-т вет. медицины, 2023. - С. 3-5. [Abgaryan SR (2023) Molecular biological methods of diagnostication of poultry diseases. In: *Proc. Intl. Sci. Pract. Conf. Dedic. To 100th Anniv. Prof. V.V. Rudakov, Saint Petersburg, May 25-26, 2023*. Saint Petersburg State Univ. Vet. Med.: 3-5 (in Russ.)]
6. Панкратов, С.В. Особенности лабораторной диагностики пастереллеза птиц / С.В. Панкратов // Аграрная наука в обеспечении продовольственной безопасности и развитии сельских территорий: Сб. мат. V Междунар. науч.-практ. конф., Луганск, 25 января - 8 февраля 2024 г. - Луганский ГАУ им. К.Е. Ворошилова, 2024. - С. 116-118. [Pankratov SV (2024) Peculiarities of laboratory diagnostication of avian pasteurellosis. In: *Contribution of Agrarian Science into Food Security and Development of Rural Areas: Proc. V Intl. Sci. Pract. Conf, Lugansk, Jan 25 - Feb 8, 2024*. Lugansk State Agrar. Univ. named after K.E. Voroshilov: 116-8 (in Russ.)]
7. Li, Y. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus from contaminated live-virus vaccines / Y. Li, Y. Hu, S. Cui, J. Fu, Y. Wang, Z. Cui, L. Fang, S. Chang, P. Zhao // Poult. Sci. - 2017. - V. 96. - No 5. - P. 1045-1051. doi: 10.3382/ps/pew406
8. Рождественская, Т.Н. Респираторный синдром птиц / Т.Н. Рождественская, С.В. Панкратов, А.В. Рузина, О.Б. Новикова // Современные научные разработки и передовые технологии для промышленного птицеводства: Сб. ст. науч.-практ. конф., СПб, 12-14 июля 2023 г. - СПб.: Медиапапир, 2023. - С. 124-128. [Rozhdestvenskaya TN, Pankratov SV, Ruzina AV, Novikova OB (2023) Avian respiratory syndrome. In: *Modern Scientific Innovations and Advanced Technologies for Commercial Poultry Farming: Proc. Sci. Pract. Conf., Saint Petersburg, Jul 12-14, 2023*. Saint Petersburg, Mediapapir Publ.: 124-8 (in Russ.)]
9. Lai, G.H. Characterization of the DNA binding activity of structural protein VP1 from chicken anaemia virus / G.H. Lai, M.K. Lin, Y.Y. Lien, J.H. Cheng, F.C. Sun, M.S. Lee, H.J. Chen, M.S. Lee // BMC Vet. Res. - 2018. - V. 14. - No 1. - P. 155. doi: 10.1186/s12917-018-1465-5
10. Sun, F. Identification of the interaction and interaction domains of chicken anemia virus VP2 and VP3 proteins / F. Sun, W. Pan, H. Gao, X. Qi, L. Qin, Y. Wang, Y. Gao, X. Wang // Virology. - 2018. - V. 513. - P. 188-194. doi: 10.1016/j.virol.2017.09.014
11. Gowthaman, V. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus isolated from commercial poultry with respiratory disease complex in India / V. Gowthaman, S.D. Singh, K. Dhama, R. Barathidasan, S. Palani, N.K. Mahajan, M.A. Ramakrishnan // Adv. Anim. Vet. Sci. - 2014. - V. 2. - No 3. - P. 171-176. doi: 10.14737/journal.aavs/2014/2.3.171.176
12. Абгарян, С.Р. Диагностика инфекционного бронхита кур и метапневмовирусной инфекции птиц методом ПЦР / С.Р. Абгарян // Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК: Сб. мат. Междунар. науч.-практ. конф., посв. памяти проф. Х.Х. Абдуллина, Казань, 28-29 ноября 2024 г. - Казань: Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, 2024. - С. 3-6. [Abgaryan SR (2024) Diagnosis of infectious bronchitis in avian and metapneumovirus infection in birds by PCR. In: *Innovative Solutions of Urgent Problems of Biological, Toxicological, and Radiological Safety for Agroindustry: Proc. Intl. Sci. Pract. Conf. Dedic. Memor. Prof. Kh.Kh. Abdullin, Kazan, Nov 28-29, 2024*. Kazan, Federal Center for Toxicological, Radiological, and Biological Safety: 3-6 (in Russ.)]
13. Wu, X. A new rapid and sensitive method for detecting chicken infectious anemia virus / X. Wu, J. Kong, Z. Yao [et al.] // Front. Microbiol. - 2022. - V. 13. - P. 994651. doi: 10.3389/fmicb.2022.994651.
14. Абгарян, С.Р. Специфические аспекты диагностики и профилактики метапневмовирусной инфекции птиц / С.Р. Абгарян // Аграрная наука в обеспечении продовольственной безопасности и развитии сельских территорий: Сб. мат. V Междунар. науч.-практ. конф., Луганск, 25 января - 8 февраля 2024 г. - Луганский ГАУ им. К.Е. Ворошилова, 2024. - С. 70-72. [Abgaryan SR (2024) Specific aspects of diagnostication and prevention of metapneumoviral infection in poultry. In: *Contribution of Agrarian Science into Food Security and Development of Rural Areas: Proc. V Intl. Sci. Pract. Conf, Lugansk, Jan 25 - Feb 8, 2024*. Lugansk State Agrar. Univ. named after K.E. Voroshilov: 70-2 (in Russ.)]

Сведения об авторах:

Дмитриев К.Ю.: кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела молекулярно-биологических исследований; vnivip.dmitriev-18@yandex.ru. **Семина А.Н.:** кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярно-биологических исследований; anna14.05@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 29.06.2025; одобрена после рецензирования 10.08.2025; принята к публикации 25.08.2025.

Research article

Development of a Real-Time PCR Assay for the Diagnostication of Chicken Infectious Anemia

Konstantin Y. Dmitriev, Anna N. Semina

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"

Abstract. *Chicken infectious anemia (CIA) is a significant problem in all countries with developed large-scale poultry production. The wide spread of CIA virus, its immunosuppressive effect on chickens due to damage to lymphoid organs, increased risk of secondary infections of various etiology, reduced effectiveness of specific prophylaxis, livability and productivity in poultry are the causes of significant economic damage related to this disease. The isolation and identification of the causative agent of CIA using virological methods is difficult and hence the diagnostication by molecular biological methods is relevant and promising. In the study presented a new highly sensitive and specific assay based on the real-time polymerase chain reaction (PCR-RT) method to detect the genome of the CIA virus is presented. Primers to the overlapping conserved VP2-VP3 region of the genome were selected, their specificity and sensitivity were proved, and reaction conditions were optimized. The results obtained indicated that these primers allow for the detection of CIA viral genome with high accuracy, which significantly improves the possibility of early diagnostication of the infection, as well as in cases of subclinical and associated courses of the disease.*

Keywords: *chicken infectious anemia (CIA), CIA virus, diagnostics, polymerase chain reaction (PCR), DNA.*

For Citation: *Dmitriev K.Y., Semina A.N. (2025) Development of a real-time PCR assay for the diagnostication of chicken infectious anemia. Ptitsevodstvo,* ***74****(9): 66-70. (in Russ.)*
doi: 10.33845/0033-3239-2025-74-9-66-70

(For references see above)

Authors:

Dmitriev K.Y.: Cand. of Vet. Sci., Senior Research Officer, Dept. of Molecular Biological Research; vnivip.dmitriev-18@yandex.ru. **Semina A.N.:** Cand. of Vet. Sci., Lead Research Officer, Dept. of Molecular Biological Research; anna14.05@mail.ru.

Submitted 29.06.2025; revised 10.08.2025; accepted 25.08.2025.

© Дмитриев К.Ю., Семина А.Н., 2025

ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

Упрощение регистрации кормовых добавок с ГМО в России: новые возможности для производителей

Согласно информации, предоставленной Россельхознадзором, теперь компании смогут подавать заявление на регистрацию как ГМО, так и самой кормовой добавки в рамках одной комплексной услуги через портал «Госуслуги». Это значит, что производители больше не обязаны сначала проходить отдельную процедуру регистрации генно-модифицированного организма, а затем переходить к регистрации кормовой добавки. Данная схема вступит в силу с октября 2025 года.

Процесс регистрации будет включать в себя заполнение заявления на госрегистрацию ГМ-организма, к которому необходимо приложить два вида исследований: молекулярно-генетические и исследования, подтверждающие биобезопасность. В случае положительного решения, производитель получит предзаполненную форму нового заявления на регистрацию кормовой добавки, что существенно упростит процесс. Срок оформления всех необходимых документов останется прежним и не превысит 37 рабочих дней.

Источник: korovainfo.ru