Научная статья

УДК 578.222:578.522:577.212.3:57.088.1

Идентификация вируса инфекционной анемии цыплят методом полимеразной цепной реакции

Анна Николаевна Семина, Константин Юрьевич Дмитриев

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) – высококонтагиозная вирусная болезнь, вызываемая ДНК-вирусом сем. Anelloviridae. В настоящее время болезнь имеет широкое распространение в странах с развитым птицеводством. Репликация вируса происходит преимущественно в гемоцитобластах костного мозга, предшественниках Т-клеток тимуса и лимфоцитах селезенки. На фоне этого развиваются атрофические процессы в костном мозге, кроветворных и лимфоидных органах и тканях, в результате чего возникает апластическая анемия и нарастающая иммунодепрессия. Приоритет диагностики ИАЦ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обусловлен способностью данного метода выявлять ДНК возбудителя независимо от формы течения болезни, скоростью проведения анализа, его высокой чувствительностью и специфичностью. В качестве целевого участка для подбора праймеров был выбран регион, отвечающий за кодирование вирусного белка VP2. В серии экспериментов были определены оптимальные температурно-временные режимы амплификации с использованием подобранных праймеров. Было установлено, что данная пара праймеров позволяет эффективно амплифицировать искомый фрагмент ДНК возбудителя ИАЦ, о чем свидетельствует детекция специфического продукта в агарозном геле на уровне 307 п.н., а также обладает высокой чувствительностью и специфичностью.*

Ключевые слова: *вирус инфекционной анемии цыплят, птица, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ДНК, праймер, иммунодепрессия.*

Для цитирования: *Семина, А.Н. Идентификация вируса инфекционной анемии цыплят методом полимеразной цепной реакции / А.Н. Семина, К.Ю. Дмитриев // Птицеводство. – 2024. – №3. – С. 47-51.*
doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-3-47-51

Введение. Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) – болезнь вызываемая ДНК-вирусом сем. *Anelloviridae*. Наиболее восприимчивы цыплята до 2-недельного возраста. Инфекция характеризуется поражением костного мозга, атрофией кроветворных и лимфоидных органов и тканей, что приводит к апластической анемии и нарушению функции иммунной системы [1]. Вирус инфекционной анемии цыплят (ВАЦ) представляет собой безоболочечную частицу икосаэдрической формы с кубическим типом симметрии диаметром от 25,0 до 26,5 нм. Размер генома ВАЦ составляет примерно 2,3 т.п.н. [2].

На сегодняшний день сообщения о возникновении ИАЦ регистрируются во всех странах с развитым птицеводством. Болезнь в первую очередь поражает цыплят в возрасте от 1 до 3 недель, тогда как у цыплят старших возрастов инфекция обычно протекает субклинически [3,4]. В настоящее время установлено, что, помимо кур, варианты ВАЦ способны инфицировать индеек, мышей, кошек, собак и человека. Передача ВАЦ происходит вертикальным (трансовариальным) и горизонтальным путями. При горизонтальном пути передачи инфицирование происходит при непосредственном контакте с носителем инфекции, с зараженной водой и кормом, а также воздушно-капельным путем.

Для выделения ВАЦ можно использовать 5-6-суточные СПФ-куриные эмбрионы или клеточные культуры MDCC-MSB1, MDCC-JP2 и других линий Т- и В-клеток [5,6].

Установлено, что основными вирусными белками ВАЦ являются капсидный белок VP1 (51,6 кДа), конформационный белок VP2 (24,0 кДа) и белок VP3 (13,6 кДа), индуцирующий апоптоз [7]. В силу того, что белок VP1 имеет довольно изменчивую структуру, а также несет на себе эпитопы, отвечающие за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами, считается, что он играет важную роль в репликации, изменчивости и распространении ВАЦ [8,9]. Белок VP2 является многофункциональным: поми-

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагмента ДНК вируса ИАЦ

Название праймера	Последовательность	Размер ампликона, п.н.
Forward	CATGAACGCTCTCCAAGAAGATA	307
Revers	CAGTCTTATACACCTTCTTGC	

Таблица 2. Режим амплификации со специфическими праймерами для ВАЦ

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	3 мин	1
95 60 72	15 сек 30 сек 20 сек	35
72	3 мин	1

мо конформационной функции, он принимает участие в процессе репликации вируса, обладает антигенной активностью и, так же, как VP1, вовлечен в процесс взаимодействия с вируснейтрализующими антителами [10,11].

Белок VP3, являясь индуктором апоптоза, имеет ключевое значение в развитии масштабной лимфоидной атрофии и анемии, вызванной разрушением Т-лимфоцитов [12].

При ИАЦ происходит диссеминация возбудителя во многие внутренние органы и ткани птицы (печень, костный мозг, тимус, селезенка, фабрициева сумка, сердце, легкие, мышцы), что свидетельствует о генерализованном характере инфекции [13].

Выделение и идентификация возбудителя является основанием для постановки окончательного диагноза. Однако диагностика ИАЦ общепринятыми вирусологическими методами затруднена. В настоящее время наиболее доступным, легко воспроизводимым и высокочувствительным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [14,15].

В связи с этим, наши исследования были направлены на подбор специфических олигонуклеотидных последовательностей, которые позволят быстро и достоверно выявлять ДНК ВАЦ в исследуемом патматериале.

Материал и методика исследований. Источником получения данных о полных и частичных последовательностях ДНК ВАЦ была база данных GenBank (NCBI). Для анализа полученных последовательностей использовали инструментарий NCBI, а также программу MEGA 11. Подбор праймеров осуществляли с использованием программы Gene Runner 6.5, анализ вторичных структур и возможности неспецифической гибридизации проводился с использованием алгоритмов BLAST (NCBI) и программного обеспечения Oligo Analyzer 1.0.3.

Полученные праймеры апробировали с использованием вакцинного штамма ВАЦ 26P4 (Nobilis® CAV P4). Экстракцию ДНК проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Амплификацию проводили в термоциклере «ТЕРЦИК», в котором устанавливали экспериментально подобранный температурно-временной режим. Анализ проводился в 25 мкл реакционной смеси содержащей по 1 мкл каждого праймера, 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix с Taq ДНК-полимеразой, 10 мкл экстракта ДНК ВАЦ и 8 мкл воды для ПЦР, свободной от нуклеаз. С целью исключения контаминации аналогично ставился отрицательный контроль. Для предотвращения испарения реакционной смеси при нагревании на ее поверхность наслаивали 15 мкл минерального масла.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Оценку результатов электрофоретической детекции осуществляли на специальной гельдокументирующей системе. Размер фрагмента детектируемой ДНК определяли при помощи молекулярного маркера.

Для оценки аналитической чувствительности готовили серию последовательных десятикратных разведений ДНК вакцинного штамма ВАЦ. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектируемому в трех повторностях.

Специфичность подобранных праймеров оценивали с помощью амплификации проб, содержащих ДНК ВАЦ, и проб, содержащих ДНК гетерогенных вирусов.

Результаты исследований и их обсуждение. Используя встроенный инструментарий NCBI, а также открытое программное обеспечение MEGA 11, был проведен анализ полученных последовательностей. По результатам анализа последовательностей ДНК ВАЦ в качестве целевого региона для подбора праймеров была выбрана область, отвечающая за кодирование белка VP2. Для амплификации данной области наиболее подходящими были праймеры, представленные в табл. 1.

Важным этапом при дизайне праймеров является оптимизация

условий постановки ПЦР. Чтобы максимально снизить возможность неспецифических взаимодействий в процессе амплификации, необходимо подобрать оптимальные временные параметры и температуру отжига праймеров. В ходе исследований был подобран оптимальный температурно-временной режим амплификации, представленный в табл. 2.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле, окрашенном раствором бромистого этидия. Реакцию ставили с использованием отрицательного контроля, с которым сопоставляли полученные результаты. Образующийся в результате амплификации фрагмент длиной 307 п.н. указывает на наличие в исследуемом материале целевого фрагмента ДНК ВАЦ (рис. 1).

Предварительная оценка аналитической специфичности используемых праймеров с помощью алгоритма BLAST показала отсутствие гомологии выбранных последовательностей с другими вирусами.

При экспериментальной оценке чувствительности ПЦР с подобранными праймерами использовали серию десятикратных разведений вирусной ДНК. По результатам исследований пределом чувствительности было разведение 10^{-5} (рис. 2).

Проверку специфичности выбранных праймеров проводили в исследованиях с гетерогенными вирусами, такими как вирусы ньюкаслской болезни и инфекционного ларинготрахеита, классический и вариантный штаммы вируса инфекционного бронхита кур. Как видно из рис. 3, специфический продукт образовался лишь в пробе, содержащей ДНК ВАЦ, что подтверждает специфичность сконструированных праймеров.

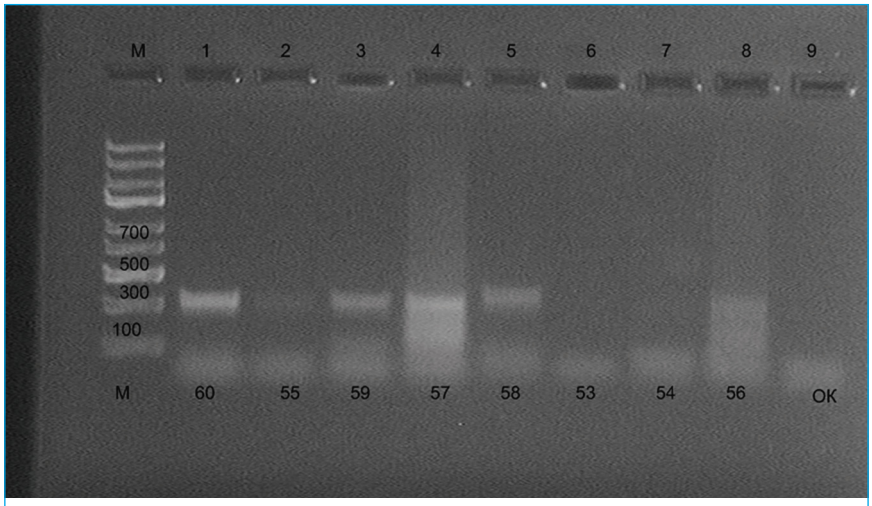

Рис. 1. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента ДНК вируса инфекционной анемии цыплят. 1-8 – пробы содержащие ДНК возбудителя ИАЦ; 9 – отрицательный контроль; М – маркер молекулярной массы

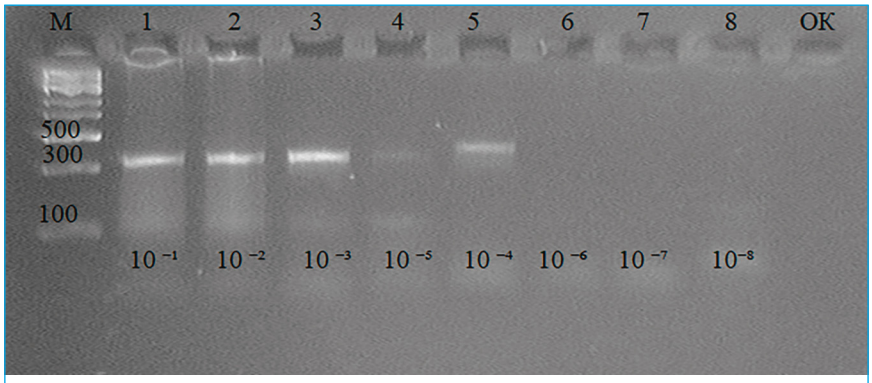

Рис. 2. Результаты оценки чувствительности праймеров для определения ДНК ВАЦ. М – молекулярный маркер; 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} – десятикратные разведения вирусной ДНК ВАЦ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – образец пробы, содержащий ДНК ВАЦ; ОК – отрицательный контроль

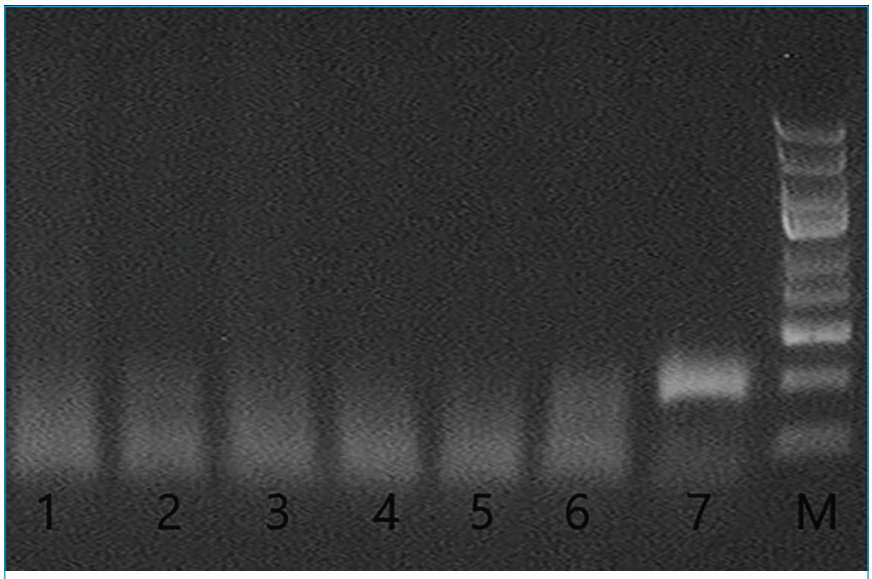

Рис. 3. Результаты исследования специфичности праймеров ВАЦ. 1 – отрицательный контроль; 2, 3, 4, 5, 6 – образцы проб, содержащие кДНК и ДНК гетерогенных вирусов; 7 – проба, содержащая ДНК ВАЦ; М – молекулярный маркер

Заключение. ИАЦ продолжает оставаться болезнью, которая наносит птицеводческим хозяйствам значительный экономический ущерб, который складывается из потерь от снижения продуктивности и качества мясной продукции, падежа птицы, снижения конверсии корма и повышения затрат на ветеринарные препараты. Кроме этого, ВАЦ способен разрушать целые звенья иммунной системы, что приводит к снижению эффективности специфической профилактики, а также возникновению ассоциированных инфекций и усилению патогенности возбудителей инфекционных болезней различной этиологии. Чтобы уменьшить экономические потери от возникновения данной болезни, необходимо своевременно осуществлять диагностические и мониторинговые исследования. Обнаружение ДНК возбудителя ИАЦ с помощью ПЦР является чувствительным и специфичным методом диагностики. В ходе наших исследований были подобраны праймеры, позволяющие выявлять ДНК ВАЦ в исследуемом материале. Экспериментально было подтверждено, что данные праймеры обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут быть использованы для диагностики ИАЦ.

Исследования проведены по госзаданию №122031400-337-6.

Литература / References

1. Дмитриева, М.Е. Инфекционная анемия цыплят и качество мяса бройлеров / М.Е. Дмитриева // Птица и птицепродукты. - 2016. - №4. - С. 48-49.
2. Гусева, Е.В. Инфекционная анемия цыплят: Обзор литературы / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина. - Владимир: ОК НИИ и МС ВНИИЗЖ, 1997. - 72 с.
3. Дмитриева, М.Е. Диагностика инфекционной анемии цыплят с использованием молекулярно-биологических методов исследований / М.Е. Дмитриева, М.А. Занько, А.Н. Семина, С.Р. Абгарян // Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего. Мат. XIX Междунар. конф. ВНАП, Сергиев Посад, 15-18 мая 2018 г. - С. 600-602.
4. Дмитриева, М.Е. Специфическая профилактика инфекционной анемии цыплят, ее последствия и перспективы / М.Е. Дмитриева // Птица и птицепродукты. - 2016. - №6. - С. 43-44.
5. Fang, L. Genetic analysis of two chicken infectious anemia virus variants-related Gyrovirus in stray mice and dogs: the first report in China, 2015 / L. Fang, Y. Li, Y. Wang, J. Fu, S. Cui, X. Li, S. Chang, P. Zhao // BioMed. Res. Intl. - 2017. - ID 6707868. - 9 pp. doi: 10.1155/2017/6707868
6. Панкратов, С В. Метапневмовирусная инфекция птиц / С.В. Панкратов, С.Р. Абгарян // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. - 2022. - №3. - С. 36-39. doi: 10.52419/issn2782-6252.2022.3.36
7. Rao, P.L. Whole genome analysis and molecular characterization of chicken infectious anemia virus from an outbreak in a layer flock reveals circulation of genogroup IIIb in South India / P.L. Rao, E. Priyanka, T.R. Kannaki, M. Subbiah // Virus Res. - 2022. - V. 308. - P. 198649. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198649
8. Noteborn, M.H. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope / M.H. Noteborn, C.A. Verschueren, G. Koch, A.J. Van der Eb // J. Gen. Virol. - 1998. - V. 79. - No 12. - P. 3073-3077. doi: 10.1099/0022-1317-79-12-3073
9. Renshaw, R.W. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture / R.W. Renshaw, C. Soiné, T. Weinkle, P.H. O'Connell, K. Ohashi, S. Watson, B. Lucio, S. Harrington, K.A. Schat // J. Virol. - 1996. - V. 70. - No 12. - P. 8872-8878. doi: 10.1128/JVI.70.12.8872-8878.1996
10. Cheng, J.H. Identification of nuclear localization signal and nuclear export signal of VP1 from the chicken anemia virus and effects on VP2 shuttling in cells / J.H. Cheng, G.H. Lai, Y.Y. Lien, F.C. Sun, S.L. Hsu, P.C. Chuang, M.S. Lee // Virol. J. - 2019. - V. 16. - No 1. - P. 45. doi: 10.1186/s12985-019-1153-5
11. Cheng, J.H. Identification of the NLS and NES motifs of VP2 from chicken anemia virus and the interaction of VP2 with mini-chromosome maintenance protein 3 / J.H. Cheng, S.C. Sheu, Y.Y. Lien, M.S. Lee, H.J. Chen, W.H. Su, M.S. Lee // BMC Vet. Res. - 2012. - V. 8. - P. 15. doi: 10.1186/1746-6148-8-15
12. 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
13. Schat, K.A. Chicken anemia virus / K.A. Schat // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 2009. - V. 331. - P. 151-184. doi: 10.1007/978-3-540-70972-5_10

14. Абгарян, С.Р. Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц с применением мультиплексной ПЦР / С.Р. Абгарян, С.В. Панкратов, А.Н. Семина // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. - 2022. - №4. - С. 42-45. doi: 10.52419/issn2782-6252.2022.4.42
15. 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 рождения проф. В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25-26 мая 2023 г. - Санкт-Петербургский ГУВМ, 2023. - С. 3-5.

Сведения об авторах:

Семина А.Н.: кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник - зав. отделом диагностики и эпизоотологического анализа; anna14.05@mail.ru. **Дмитриев К.Ю.:** кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник отдела диагностики и эпизоотологического анализа; vnivip.dmitriev-18@yandex.ru.

Статья поступила в редакцию 13.01.2024; одобрена после рецензирования 02.02.2024; принята к публикации 14.02.2024.

Research article

Identification of Chicken Infectious Anemia Virus by PCR

Anna N. Semina, Konstantin Y. Dmitriev

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of the Federal Scientific Center
“All-Russian Research and Technological Institute of Poultry”

Abstract. *Chicken infectious anemia (CIA) is a highly contagious viral disease caused by DNA virus of the family Anelloviridae. Currently the disease is widely spread in countries with developed poultry production. Virus replication occurs mainly in hemocytoblasts of bone marrow, precursors of T-cells of thymus and lymphocytes of spleen, accompanied by the atrophic processes in the bone marrow, hematopoietic and lymphoid organs and tissues resulting in aplastic anemia and increasing immunosuppression. The priority of diagnostics of CIA by polymerase chain reaction (PCR) is related to the ability of this method to identify the viral DNA regardless of the clinical form of the disease, the rapidity of the analysis, its high sensitivity and specificity. The region responsible for the coding of the viral protein VP2 was chosen as the target site for primer selection. In a series of experiments the optimal temperature and time modes of amplification using a pair of selected primers were determined. It was found that this pair of primers allows efficient amplification of the desired DNA fragment of the CIA virus as evidenced by the detection of the specific product in agarose gel at the level of 307 bp; high sensitivity and specificity of the method were experimentally confirmed.*

Keywords: *chicken infectious anemia virus, poultry, polymerase chain reaction (PCR), DNA, primer, immunosuppression.*

For Citation: *Semina A.N., Dmitriev K.Y. (2024) Identification of chicken infectious anemia virus by PCR. Ptitsevodstvo, 73(3): 47-51. (in Russ.)*
doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-3-47-51

(For references see above)

Authors:

Semina A.N.: Cand. of Vet. Sci., Lead Research Officer, Head of Dept. of Diagnostics and Epizootological Analysis; anna14.05@mail.ru. **Dmitriev K.Y.:** Cand. of Vet. Sci., Junior Research Officer, Dept. of Diagnostics and Epizootological Analysis; vnivip.dmitriev-18@yandex.ru.

Submitted 13.01.2024; revised 02.02.2024; accepted 14.02.2024.

© Семина А.Н., Дмитриев К.Ю., 2024