

Бекбергел А.Т., Сарсембаева Н.Б., Мұстафина Ш.А.

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы

ҚҰС ШАРУАШЫЛЫҒЫ ӨНІМДЕРІ ҚҰРАМЫНДАҒЫ АНТИБИОТИКТЕРДІҢ ҚАЛДЫҚ МӨЛШЕРІНІҢ МОНИТОРИНГІ

Аңдатпа

Антибиотиктерді емдік және өсуді ынталандыру мақсатында кеңінен пайдалануда құс шаруашылығы өнімдері құрамында антибиотиктердің қалдық мөлшерінің анықталуына алып келді. Зерттеу нәтижелері тағам өнімдерінде антибиотиктерді анықтаудың әдістерін, құс өшаруашыдығы өнімдері мен шикізаттың ветеринарлық және санитарлық бағалауды жақсарту керектігін көрсетті.

Кілт сөздер: мониторинг, антибиотиктердің қалдық мөлшері, құс шаруашылығы, бактерия штаммдары, диффузия әдісі.

УДК: 619:578:578.2/578.5

Есимбекова Н.Б., Мамбеталиев М., Абсатова Ж.С., Бурашев Е.Д., Абдураимов Е.О.

*РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
КН МОН РК пгт. Гвардейский, Жамбылская область*

ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ СЕВЕРОАМЕРИКАНСКОГО ГЕНОТИПА В КАРАГАНДИНСКОЙ ОБЛАСТИ КАЗАХСТАНА

Аннотация

В статье приведены результаты выделения нового изолята вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), из свиноводческого хозяйства «Жана-Ай» Карагандинской области Казахстана. Сравнительные генетические исследования выделенного изолята со штаммом «Arterivirus/LKZ/2010» вируса РРСС, выделенным ранее в Жамбылской области показали 100% идентичность.

Ключевые слова: вирус, изолят, генотип, РРСС.

Введение

Репродуктивно-респираторный синдром свиней - вирусная болезнь, характеризующаяся наличием двух клинических форм (репродуктивные нарушения у взрослых свиней, пневмония у молодняка) с высоким уровнем смертности у молодых поросят [1]. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Arteriviridae, роду Arterivirus, порядку Nidovirales. В 1990 году вирус РРСС установлен в Германии, а к середине 90-х годов им была охвачена почти вся Европа. С 1993 года он регистрируется в России и в других странах СНГ [2, 3].

Актуальность вируса РРСС для сельского хозяйства обусловлена тем, что данное заболевание приносит огромный экономический ущерб, состоящий из снижения репродуктивной способности маточного поголовья и продуктивности животных, недополучения приплода, а также затрат на проведение противоэпизоотических и профилактических мероприятий [4, 5]. Известно, что вирус РРСС подразделяется на две геногруппы: европейскую и североамериканскую, между которыми имеются определенная генетическая, антигенная связь и существенные отличия [6].

В результате проведения мониторинговых исследований на территории Казахстана сотрудниками Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) были установлены наличие РРСС североамериканского в Жамбылской области и европейского генотипов в Костанайской области [7-9]. Вирус РРСС очень изменчив - генетические различия между российскими изолятами составляют до 17 % [10-12].

Таким образом, выделение новых изолятов вируса РРСС, циркулирующего на территории Казахстана, определения его принадлежности к тому или иному генетическому типу, с целью использования их для разработки средств диагностики и специфической профилактики является актуальной задачей.

Материалы и методы

При проведении исследований по выделению изолята вируса РРСС были использованы патологические материалы от больных, вынужденно убитых и павших свиней (кровь, легкие, печень, лимфатические узлы) из хозяйства «Жана-Ай» Карагандинской области Республики Казахстан, где имело место клиническое проявление РРСС. Вирус был изолирован в сертифицированной культуре клеток MARC-145 (клон МА-104).

Выделение РНК вируса РРСС

Выделение РНК проводили из очищенного и концентрированного вируссо-державшего материала с использованием Trizol, фирмы Invitrogen, согласно инструкции производителя.

Постановка полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Наработку сегментов генома вируса РРСС проводили с помощью коммерческих наборов для обратной транскрипции «SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq» и Acuprime High-Fidelity, фирмы Invitrogen по инструкции изготовителя. Праймеры для наработки сегментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для ОТ-ПЦР

Наименование	Последовательность 5'-3'	Размер продукта, п.н.
RRS_F	GAGTTTCAGCGGAACAATGG	451
RRS_R	GCCGTTGACCGTAGTGGAG	

ПЦР проводили в термоциклере «GeneAmp PCR System 9700», производства «Applied Biosystems» (США).

Экстрагирование ПЦР-продукта из геля

Экстрагирование сегмента вирусного гена из агарозного геля проводили с использованием набора QIAquick Gel Extraction kit (250), фирмы Qiagen, согласно инструкции производителя.

Секвенирование

Подготовку проб для секвенирования проводили с использованием набора "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" фирмы Applied Biosystems. Секвенирование проводили на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе "3130xl Genetic Analyzer" (Applied Biosystems/Hitachi). Анализ и сборку нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Sequencher v 4.0.

Сравнительный анализ

Сравнительный анализ по нуклеотидным последовательностям проводили в программных модулях веб-сайта NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

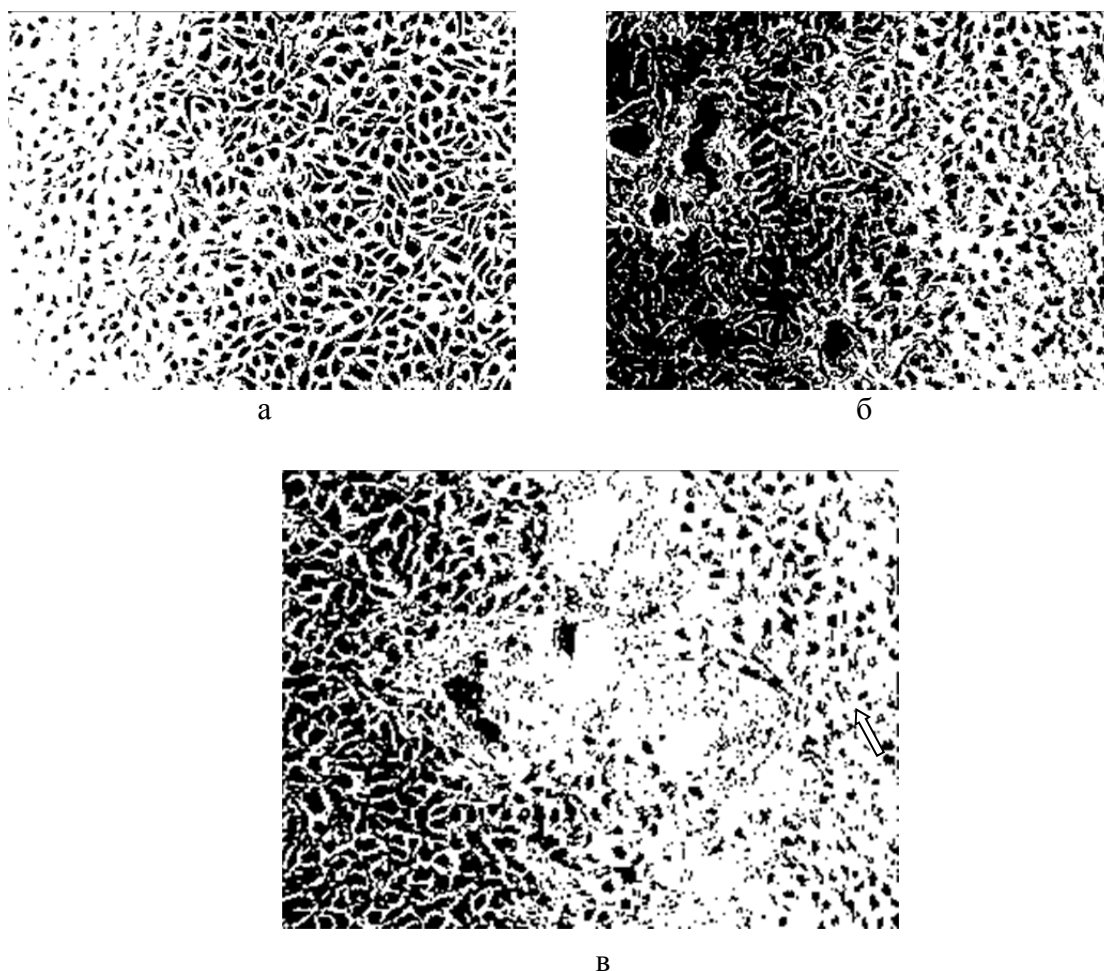
Результаты и их обсуждение

По данным Е.А. Балашовой и ученых НИИПББ чувствительным к вирусу РРСС является переживаемая культура клеток MARC-145 (клоновый вариант, полученный из

перевиваемой культуры клеток МА-104 почки африканской зеленой мартышки) [13-15]. В связи с этим выделение вируса проводили в сертифицированной культуре клеток MARC-145.

По литературным данным первые признаки ЦПД вируса РРСС в виде сферических образований клеток, приподнимающихся над поверхностью монослоя, отмечают через 2-3 дня после инокуляции вируса. Уплотнение оболочек клеток, образование цитоплазматических выростов на поверхности клеток, потерю клетками части цитоплазматического вещества, и, вследствие этого, сморщивание клеток и разрушение межклеточных связей, отслоение клеток от субстрата наблюдают спустя 4-5 дней после внесения вируса [16, 17].

В культуре клеток Marc-145 изолят «Жана-Ай» вируса РРСС культивировали в течение 5 последовательных пассажей, при этом на протяжении 5 пассажей отмечено четко выраженное ЦПД. Характер проявления ЦПД согласуются с вышеуказанными литературными данными [16,17] (рис. 1), при этом титр вируса в пределах 3-5 пассажей составил $(3,25 \pm 0,14) \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.



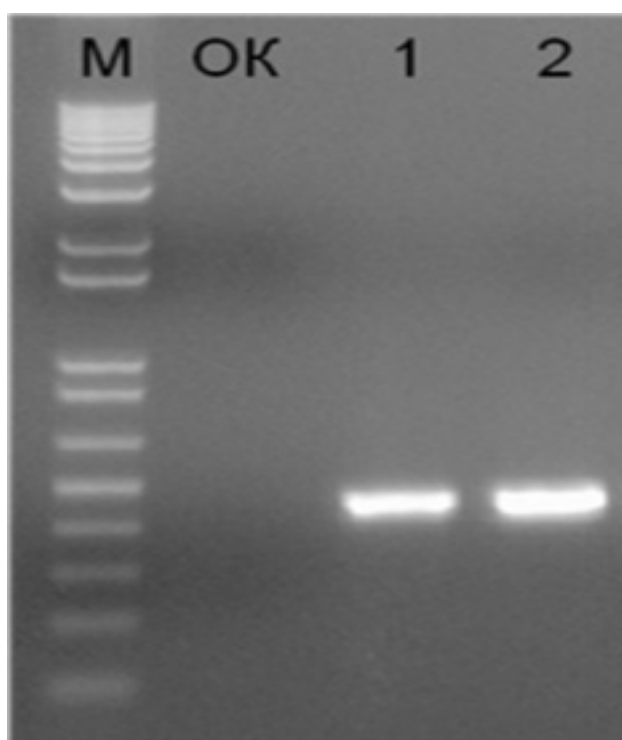
а - контроль культуры Marc-145; б – ЦПД вируса в монослое культуры клеток на 2-3 сутки; в - ЦПД вируса в монослое культуры клеток на 4-5 сутки

Рисунок 1 - Микроскопия культуры клеток *MARC-145* до и после заражения изолятом вируса РРСС.

Исследование культуральной суспензий с проявлением ЦПД на уровне 5 пассажа в ОТ-ПЦР подтвердило наличие РНК вируса РРСС.

Последовательность полного генома вируса РРСС была представлена в 1993 году. Геном представлен одноцепочечной несегментированной РНК, размером более 15000 п.н. и содержит 7 рамок считывания (ORF) [18]. Включает в себя последовательность для 8 генов, кодирующие белки нуклеокапсида (N), матрикса (M), белки оболочки (E), GP2, GP3, GP4, а также ORF 1a и 1b кодирующую РНК-зависимую РНК полимеразу, которая покрывает более 80 % генома вируса РРСС [19].

Для типирования и генетического анализа вируса болезни РРСС, исследовали нуклеотидную последовательность М-гена. С использованием метода ПЦР специфическими праймерами, которые были представлены в таблице 1, был наработан продукт размером 451 п.н. (рис. 2).



М - Маркер, 1 kb, Invitrogen; ОК - отрицательный контроль; 1 – положительный контроль штамм «Arterivirus/LKZ/2010» вируса РРСС; 2 – выделенный изолят «Жана-Ай» вируса РРСС.

Рисунок 2 – Электрофореграмма М гена изолята «Жана-Ай» вируса РРСС

Для молекулярно-генетического анализа выделенного изолята «Жана-Ай» было проведено дальнейшее секвенирование, в результате которого были получены нуклеотидные последовательности размером 1800 п.н.

С использованием программы MEGA 6.06 и набора нуклеотидных последовательностей с известным генотипом из международной базы данных GenBank было построено филогенетическое дерево и определен генотип выделенного изолята (рис. 3).

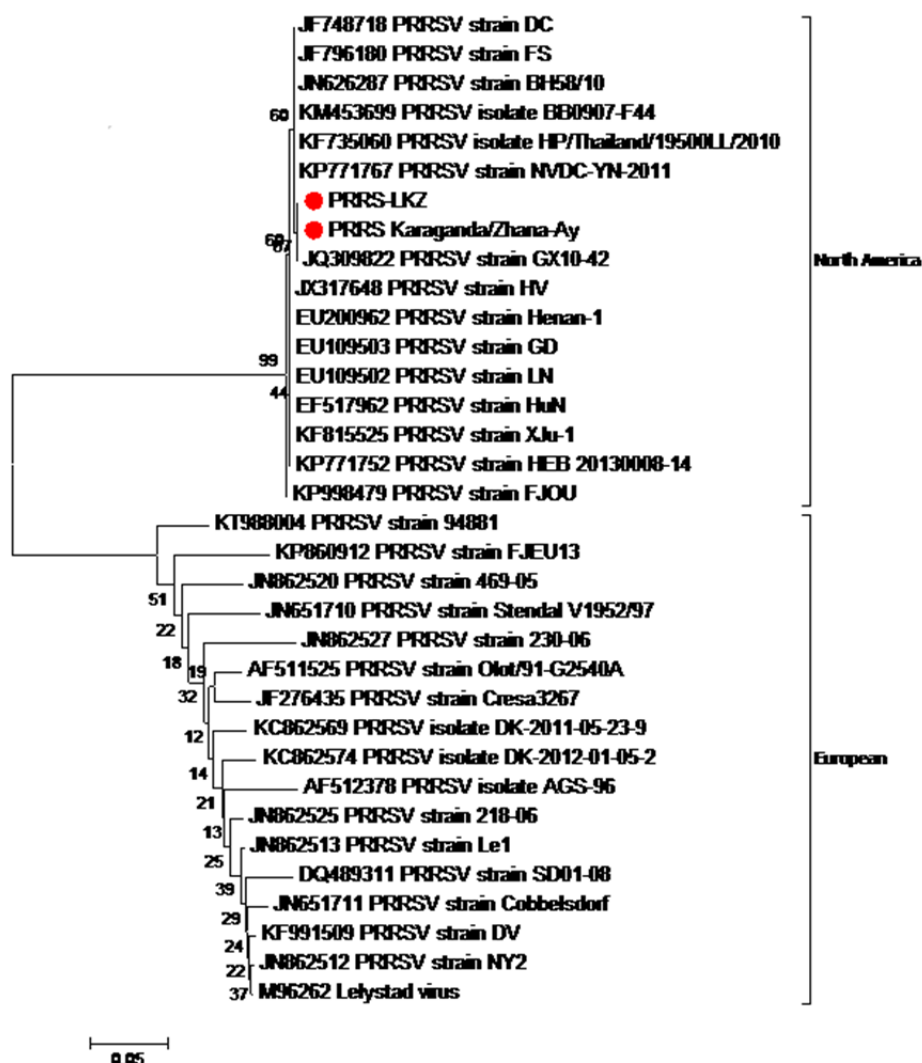


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей полноразмерного М-гена, построенное с помощью программы MEGA 6.06 по методу "ближайших соседей" (bootstrap = 500)

Согласно полученным результатам изолят «Жана-Ай» вируса РРСС относится к североамериканскому генотипу. В процессе поиска близкородственных штаммов группы РРСС по программе BLAST идентичность составила 100% с ранее выделенным в Жамбылской области штаммом «Arterivirus/LKZ/2010» вируса РРСС.

Выводы

В свиноводческом хозяйстве «Жана-Ай» Карагандинской области Республики Казахстан выделен изолят вируса РРСС североамериканского генотипа, который на 100% идентичен со штаммом «Arterivirus/LKZ/2010» вируса РРСС, выделенный в Жамбылской области республики.

Благодарность

Авторы благодарят старшего научного сотрудника лаборатории Молекулярной биологии и геномной инженерии Строчкова В.М. за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований и сотрудника лаборатории Коллекции микроорганизмов НИИПББ Килибаева С.С. в подготовке материалов для вирусологических работ.

Литература

1. *Albina E.* Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection / *E. Albina* // *Vet. Res.* – 1997. – V. 28, №4. – С. 305-352.
2. *Christianson W.T.* Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Swine Health and Production* 1994, 2(2) – P. 10-28.
3. *Кукушкин С.А.* Репродуктивно-респираторный синдром свиней (эпизоотология, диагностика, специфическая профилактика) / *С.А. Кукушкин* // *Пром. и племенное свиноводство.* – 2006. – №3. – С. 60-61.
4. *Neumann E.J., Kliebenstein J.B., Johnson C.D., Mabry J.W., Bush E.J.* Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2005. – P. 385-392.
5. *Груздев К.Н.* Мониторинг экономически значимых инфекционных болезней свиней в России / *К.Н. Груздев, Т.З. Байбиков, С.А. Кукушкин* // *Матер. Всерос. Вет. конгр.* – М. 2006. – С. 29-34.
6. *Allende R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A.* North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions // *J. Gen. Virol.* – 1999. – P. 307-315.
7. *Tabynov K.K., Mambetaliyev M., Azhibayev A.Zh., Orynbayev M.B., Zaitsev V.L., Kopochenya A.A., Azanbekova A.A., Sansyzbay A.R.* Isolation of the European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Kazakhstan // *International PRRS Symposium (20-22 May, 2013, Beijing, China)* – Beijing. - 2013. – P.114.
8. *Orynbayev M., Belloussov V., Mambetaliyev M.* Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of North American genotype in Republic of Kazakhstan. In *Proc. VII Int. Conf. Molecular diagnostic – Moscow, October 2010.* – P.159-162.
9. *Sansyzbay A.R., Tabynov K.K., Orynbayev M.B., Kopochenya A.A., Kopeyev S.K.* Pathogenicity of PRRSV isolated in Kazakhstan // *IX International Congress of Veterinary Virology and Joint Meeting with the European Society of Clinical Virology (4-7 September, 2012, Madrid, Spain).* – Madrid. – 2012. – P. 194-195.
10. *Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.Н. и др.* Диагностика и специфическая профилактика РРСС/ *Ветеринария.* – 2000. – №10. – С. 6-19.
11. *Вишняков И.Ф., Балашова Е.А., Суханова О.В. и др.* Выделение и идентификация вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в Самарской области / *Ветеринария.* – 1997. – №11. – С. 16-19.
12. *Мищенко В.А., Захаров В.М., Дудников А.И. и др.* Репродуктивно-респираторный синдром свиней в России // *Пробл. инфекц. патол. жив-х: тез. докл. конф., посвящен. 100-летию открытия вируса ящура.* – Владимир, 1997. – С. 101-102.
13. *Балашова Е.А., Куриннов В.В., Вишняков И.Ф. и др.* Чувствительность некоторых перевиваемых культур клеток к вирусу РРСС. // *Вирусн. болезни с.-х. животных.: Тез. докл. Всерос. научно-практ. конф.* – Владимир, 1995. – С. 96.
14. *Копоченя А.А., Мамбеталиев М.А., Мамадалиев С.М., Булатов Е.А., Кошематов Ж.К., Битов Н.Т., Табынов К.К., Абсатова Ж.С., Битешова Э.Т.* Изучение чувствительности различных видов культур клеток и развивающихся куриных эмбрионов к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней // *Сборник матер. межд. науч. - практ. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития», посвящённой 50-летию НИИПББ НЦБ МОН РК (19-21 мая 2008 г., Алматы)* – Алматы. – 2008. – С. 151-154.
15. *Ажибаев А.Ж., Мамбеталиев М.А., Орынбаев М.Б., Табынов К.К., Копоченя А.А., Азанбекова М.А., Джексембиев Е.Б.* Подбор чувствительной клеточной линии для

размножения казахстанских изолятов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Сбор. матер. науч. - практ. конф. молод. учен., посвящ. дню образов. Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности «Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности Республики Казахстан» (7 августа 2012 г., пгт. Гвардейский) - Алматы. – 2012. – С. 4-8.

16. Kim H.S., Kwang J., Yoon I.J., Joo H.S. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol 1993. – P. 477-483.

17. Гаврилова В.Л. Автореферат диссертации «Выделение и культивирование вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней для изготовления диагностических и вакцинных препаратов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Владимир – 2007. – С. 7-12.

18. Kapur V., Elam M.R., Pawlovich T.M. et al. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States // J.Gen. Virol. – 1996. – V. 77, №6. – P. 1271-1276.

19. Murtaugh M.P., Faaberg K.S., Lager J. et al. Genetic variation in the PRRS virus // Adv. Exp. Med. Biol. – 1998. – V. 440. – P. 787-794.

Есимбекова Н.Б., Мамбеталиев М., Абсатова Ж.С., Бурашев Е.Д., Абдураимов Е.О.

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты,
Гвардейск қалашығы*

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ҚАРАҒАНДЫ ОБЫЛЫСЫНАН ШОШҚАНЫҢ РЕПРОДУКТИВТІ-РЕСПИРАТОРЛЫ СИНДРОМЫ ВИРУСЫНЫҢ СОЛТҮСТІКАМЕРИКАЛЫҚ ГЕНОТИПІН ОҚШАУЛАУ

Аңдатпа

Бұл мақалада Қазақстанның Қарағанды облысының «Жана-Ай» шошқа шаруашылығында айналымда жүрген шошқаның репродуктивті-респираторлы синдромы вирусының изолятын бөліп алу кезінде жүргізілген зерттеулердің нәтижелері келтірілген және оның ертеректе Жамбыл облысынан бөліп алған ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» штамымен ұқсастығы анықталды.

Кілт сөздер: вирус, изолят, генотип, ШРРС.

Yessimbekova N.B., Mambetaliev M., Absatova Zh.S., Burashev Y.D., Abduraimov Y.O.

*Research Institute for Biological Safety Problems RSE
CS MES RK Gvardeyskiy, Zhambyl oblast*

ISOLATION OF THE PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS OF NORTH AMERICAN GENOTYPE IN THE KARAGANDA OBLAST OF KAZAKHSTAN

Abstract

The article shows the results of isolating the virus isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome circulating in the “Zhana-Ai” pig breeding farm in the Karaganda oblast of Kazakhstan and have established its identity with the strain of the PRRS virus “Arterivirus/LKZ/2010” previously isolated in the Zhambyl oblast.

Key words: virus, isolate, genotype, PRRS.