

УДК 636.598:619:616.34-002

Р.А. КУЛИБАБА, кандидат сельскохозяйственных наук, зав. лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики,

П.С. ЮРКО, младший научный сотрудник,

А.В. БЕЛЕЦКАЯ, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Институт животноводства НААН Украины

Молекулярная диагностика энтеритов гусей разной вирусной этиологии

В статье подробно охарактеризованы энтериты гусей разной вирусной этиологии. Показано, что причиной проявления данного заболевания наряду с парвовирусом может быть и полиомавирус. Проанализированы особенности транскрипции геномов обоих вирусов. Подробно описано применение метода полимеразной цепной реакции для детекции данных возбудителей в опытных образцах. Разработан метод дуплексной ПЦР, который может использоваться для одновременного определения в «одной пробирке» двух типов возбудителей вирусного энтерита гусей.

Энтерит гусей, парвовирус, полиомавирус, полимеразная цепная реакция, дуплексная ПЦР

Вирусный энтерит гусей (ВЭГ) – острая контагиозная болезнь молодняка гусей, которая характеризуется поражением печени, легких, катарально-геморрагическим воспалением кишечника и высокой летальностью гусят первых дней жизни. Заболевание распространено во многих европейских странах, а также в США,

Израиле, Китае, Японии, России и Украине [3, 4].

Инфицирование молодняка гусей происходит алиментарным, аэрогенным и трансвариальным путями, а также через поврежденную кожу при травмах. Переболевшая птица остается вирусоносителем в течение нескольких лет. Источник инфекции – больная птица и загряз-

ненные ее выделениями корма, вода, инвентарь и т.д. [1].

Клиническое проявление зависит от формы течения заболевания. Острая форма характеризуется скучиваньем гусят, отказом их от корма, малоподвижностью и гибелью в течение нескольких часов; подострое течение болезни – отставанием в росте и развитии, конъюнктивитами, рини-

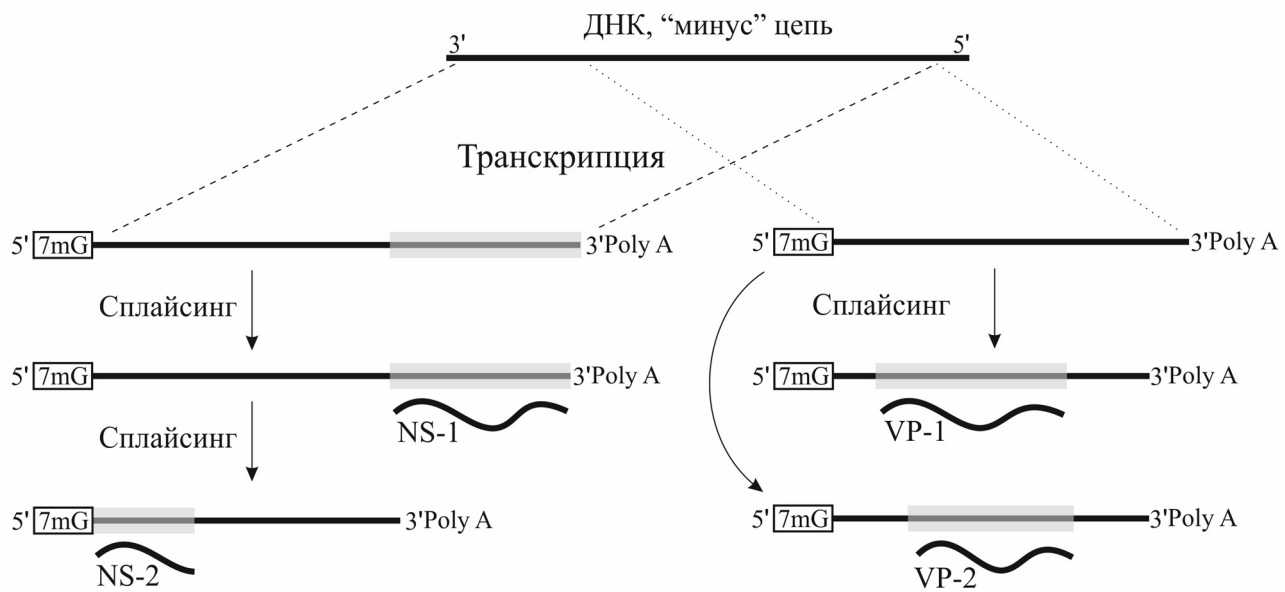


Рис. 1. Механизм транскрипции генов парвовируса

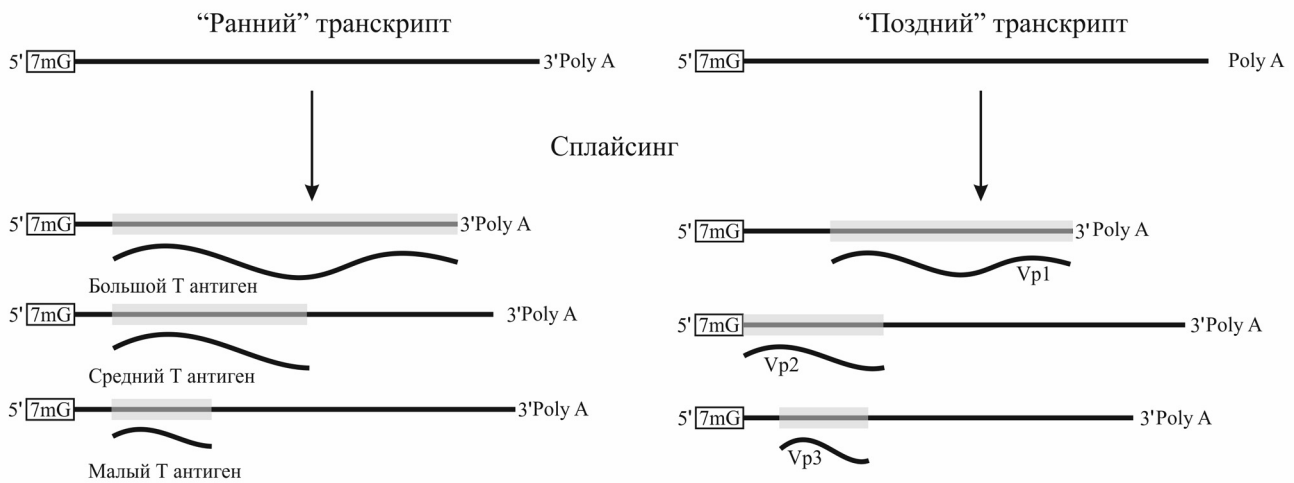


Рис. 2. Механизм транскрипции генов полиомавируса

тами, выпадением пера, тремором головы. Также отмечается водянистый понос с фибринозными или кровавыми пленками, фибринозный налет на языке; так называемая «пингвинья походка», причиной которой является асцит; покраснение кожи. Часть заболевших гусят через 1–2 недели погибает [5].

Патологоанатомические изменения у гусят регистрируются в основном в желудочно-кишечном тракте. Степень их выраженности зависит от формы течения болезни и возраста птицы. При остром течении заболевания у гусят до 14-дневного возраста обнаружи-

вается катаральный или геморрагический энтерит, у старших – фибринозный. В большинстве случаев отмечается резко выраженный кутикулит, а также асцит. Наблюдается вздутие прямой кишки, просвет наполнен жидкими массами кремового цвета. Печень увеличена, кровенаполнена, сердечная мышца имеет вид вареного мяса, селезенка и почки кровенаполнены, кожа сухая [2].

Традиционно считается, что возбудитель заболевания – вирус (GPV), относящийся к семейству Parvoviridae, подсемейству Parvovirinae, род

Dependovirus [12, 13]. По морфологии парвовирус представляет собой голые, гексагональной формы вирионы, диаметром 20 – 22 нм. [10].

Вирус устойчив к различным условиям хранения: в тканях в 30–40% растворе глицерина сохраняет активность 2 года, в замороженном виде – при -4°C и в лиофилизированном состоянии – при 4°C в течение 4-5 лет, при нагревании до 60°C в течение 15 минут не теряет вирулентности. При температуре 50°C в течение 3 часов инфекционный титр вируса не снижается [5]. Как правило, в природных условиях, к возбу-

дителю вирусного энтерита гусей восприимчивы гуси и мускусные утки возрастом от 1 до 30 дней жизни. При первых вспышках инфекции падеж может достигать от 70 до 100%. Инкубационный период продолжается от 2 до 12 дней.

Однако в последнее время на территории Украины наблюдаются случаи гибели гусят 4-10 недельного возраста с характерной для ВЭГ патологоанатомической картиной на фоне вакцинации родительских стад против данной болезни, что может указывать на другую этиологию заболевания.

Анализ литературных данных позволил предположить, что причиной энтерита, наряду с парвовирусом, может быть другой вирусный агент – полиомавирус гусей (Goose Hemorrhagic Polyomavirus, GHPV).

Впервые полиомавирус был идентифицирован в 2000 году, хотя заболевание было описано еще в 1969 году в Венгрии [11]. Заболевание, вызываемое полиомавирусом, – геморрагический нефрит-энтерит гусей (Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese, HNEG) зарегистрировано в Венгрии, Германии и Франции. Исследования относительно изучения болезни и структуры возбудителя геморрагического нефрита-энтерита гусей проводятся учеными из Венгрии, Германии, Испании и Франции [19, 20].

Установлено, что полиомавирус гусей относится к семейству Polyomaviridae, род Avipolyomavirus [15]. По строению полиомавирус представляет собой голые сферические частицы диаметром 40-50 нм. Плотность в градиенте хлористого цезия составляет 1,34-1,35 г. см⁻³. Вирус устойчив к высокой температуре, инкубация при 55°C в течение 2-х часов не снижает вирулентности. Обработка 1% раствором фенола не оказывает влияния на жизнеспособность вируса [16].

Рассмотрим более подробно особенности каждого из вирусов.

Парвовирус. Геном парвовируса состоит из одноцепочечной

1. Программы амплификации для проведения ПЦР

Стадия ПЦР	Денатурация		Отжиг	Элонгация	
Возбудитель	35 циклов				
GPV	94°C (1 мин)	94°C (15 с)	50°C (30 с)	72°C (30 с)	72°C (5 мин)
GHPV	94°C (5 мин)	94°C (30 с)	60°C (30 с)	72°C (30 с)	72°C (5 мин)

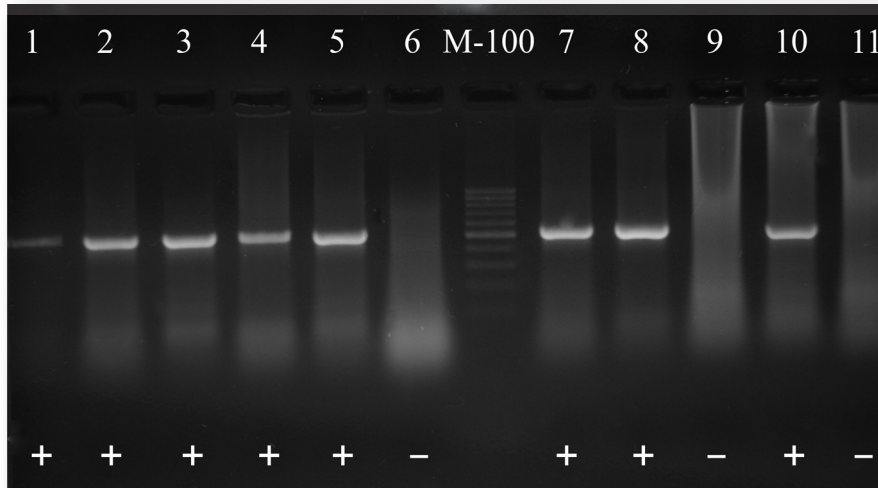


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента генома парвовируса гусей:

+ – наличие GPV; - – отсутствие GPV; M-100 – маркер молекулярных масс

“отрицательной” ДНК, размером около 5000 п.н., которая отличается от «положительной» цепи тем, что она комплементарна синтезируемой мРНК (первичному транскрипту) [17, 21].

Возникает вопрос, каким образом такое (5 тыс. п.н.), на первый взгляд, незначительное количество генетического материала кодирует 5 основных белков вируса? Ответ заключается в специфическом механизме транскрипции, который включает в себя синтез РНК с двух промоторов, а также альтернативный сплайсинг первичных транскриптов (рис. 1).

Экспрессия генов парвовируса осуществляется с двух промоторов: первый служит для регуляторных белков, второй – для структурных. Первичный транскрипт регуляторных белков первым экзонируется, полиаденилируется и подвергается сплайсингу. Вновь образовавшаяся мРНК может транслироваться с образованием белка NS-1, или далее подвергаться сплайсингу с образованием мРНК для белка NS-2.

Подобная стратегия используется также и для синтеза белков капсида VP1 и VP2 (рис. 1). Третий структурный белок, VP3, образуется в результате ферментативного расщепления (VP2) (который является, тем самым, его предшественником) в процессе формирования капсида [22].

Репликация генома парвовируса происходит в ядре клетки-хозяина и зависит от стадии клеточного цикла [9].

Полиомавирус. Одной из отличительных особенностей генома полиомавируса является наличие двухцепочечной кольцевой молекулы ДНК, размером приблизительно 5000 п.н. [8]. Экспрессия генома полиомавируса также включает в себя иницирование синтеза РНК с двух промоторных участков ДНК и альтернативный сплайсинг первичных транскриптов [7]. Рассмотрим более подробно механизм транскрипции генов полиомавируса (рис. 2).

Геном полиомавируса кодирует 6 различных белков, которые

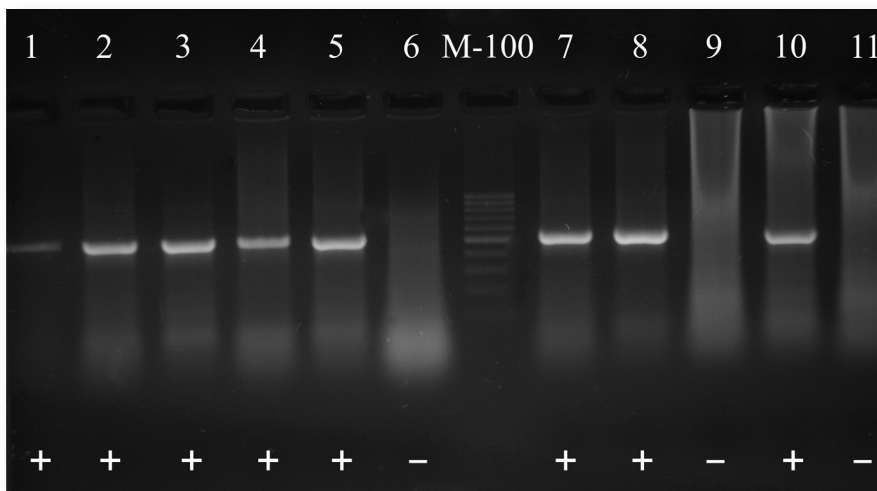


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента генома полиомавируса:

+ – наличие GHPV; – – отсутствие GHPV; M-50 – маркер молекулярных масс

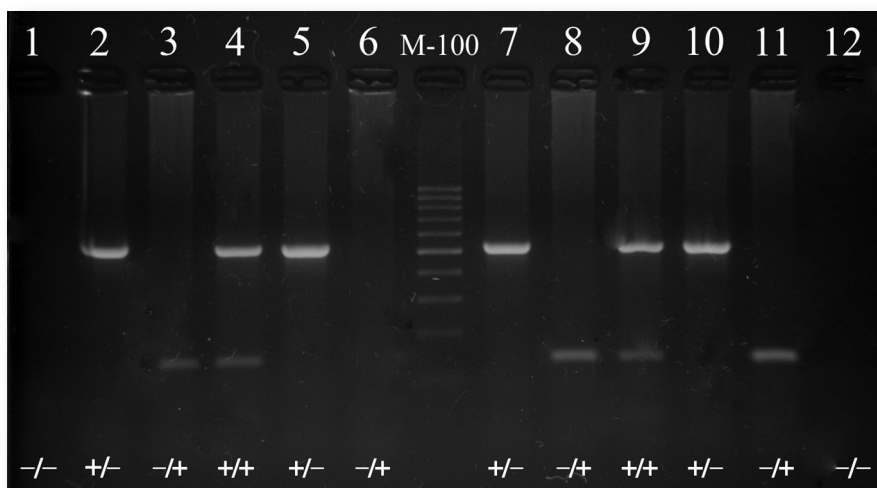


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов геномов GPV и GHPV (концентрация праймеров 0.1 μM):

1 – 12 – номера проб; M-100 – маркер молекулярных масс; +/+ – наличие GPV и GHPV; +/- – только GPV; -/+ – только GHPV; -/- – отсутствие GPV и GHPV

можно условно разделить на две группы – структурные и неструктурные (регуляторные) белки. К первому классу относятся белки VP1, VP2 и VP3, ко второму – большой, средний и малый Т-антигены. Геном данного вируса содержит в своем составе два промоторных участка, что позволяет получать различные продукты при экспрессии. РНК структурных белков транскрибируется со второго промотора (так называемые “поздние” генные транскрипты), РНК неструктурных белков – с первого (“ранние” генные транскрипты) [14]. “Ранний”

генный транскрипт кодирует все три типа регуляторных белков вируса посредством различных вариантов сплайсинга (альтернативный сплайсинг). Альтернативный сплайсинг “раннего” генного транскрипта приводит к образованию различных мРНК для регуляторных белков (рис. 2).

Подобный механизм лежит и в основе образования мРНК для белков VP1, VP2 и VP3, первичная структура которых различается вследствие соединения друг с другом различных фрагментов в результате альтернативного сплайсинга.

Переключение одного типа транскрипции на другой (с “ранних” генных продуктов на “поздние”) происходит в результате взаимодействия большого Т-антигена с исходной ДНК. Связывание Т-антигена с промотором собственного гена приводит к супрессии дальнейшей транскрипции данного участка (механизм отрицательной обратной связи) [22].

Репликация полиомавируса, как и в случае парвовируса, осуществляется в ядре клетки-хозяина. Высвобождение вирусных частиц приводит к разрушению клетки [10].

Оба описанных вируса, как GPV так и GHPV, обладают сходной морфологией, механизмами транскрипции и репликации, размером генома в целом, что приводит к ощутимым трудностям в идентификации возбудителя и правильной постановке диагноза. Исходя из всего вышеизложенного, возникает насущная необходимость в проведении точной дифференциальной диагностики вирусных энтеритов гусей с целью определения истинного возбудителя заболевания (парвовирус или полиомавирус). Использование классических, традиционных методов (вирусологические, морфологические) подчас нецелесообразно вследствие их недостаточной эффективности для решения проблем дифференциальной диагностики. Поэтому единственной, на данный момент, альтернативой является применение современных молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование).

Цель исследований – проведение дифференциальной диагностики энтеритов гусей разной вирусной этиологии с использованием полимеразной цепной реакции, а также разработка дуплексной ПЦР, позволяющей максимально эффективно определять наличие геномов парво- и полиомавирусов гусей в клиническом материале.

Материал и методы исследований. Исследования прово-

2. Программы амплификации для проведения ПЦР

дилься в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики Института животноводства НААН.

Для проведения исследований использовали ткани кишечника, печени и желудка гусей 12 – 14-дневного возраста, при патологоанатомическом исследовании которых выявили характерную для вирусного энтерита картину заболевания.

ДНК из биологического материала выделяли с помощью набора реагентов “ускоренная пробоподготовка” (Амплисенс, Россия) согласно прилагаемой инструкции. ПЦР проводили с помощью реагентов DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) с использованием программируемого термоциклера “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Объем конечной смеси составил 20 µL, концентрация праймеров – 0,4 µM. Для детекции генома полиомавируса использовали праймеры, фланкирующие консервативный участок гена VP1, для детекции парвовируса – гена VP3 [6, 18]. Для каждого типа возбудителя амплификацию проводили соответственно отдельной схемой (табл. 1). Для проверки контаминации проб использовали отрицательный контрольный образец.

Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в течение 45 мин при 120 V. Пробы визуализировали с помощью этидиума бромида в ультрафиолетовом спектре с использованием трансиллюминатора. Размер амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярных масс М-50 и М-100. Размер ампликонов в случае парвовируса составил 539 п.н., полиомавируса – 144 п.н.

Результаты исследований. На рисунке 3 представлена электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента генома парвовируса гусей.

Наличие на электрофореграмме фрагментов ДНК в виде полосок, размером 539 п.н. (определенных с помощью маркера

Стадия ПЦР	Денатурация		Отжиг	Элонгация	
Возбудитель	35 циклов				
GPV+ GHPV	94°C (5 мин)	94°C (45 с)	60°C (45 с)	72°C (45 с)	72°C (5 мин)

молекулярных масс) указывает на присутствие генома парвовируса гусей в пробе (рис. 3).

На рисунке 4 представлена электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента генома полиомавируса.

Наличие на электрофореграмме фрагментов ДНК размером 144 п.н. указывает на присутствие генома полиомавируса в пробе (рис. 4).

Как показывают результаты исследований, энтериты гусей могут быть вызваны как парвовирусом, так и полиомавирусом. Исходя из этого, а также принимая в расчет необходимость максимально увеличить эффективность диагностики, при одновременном снижении ее себестоимости, нами была поставлена цель разработать так называемую дуплексную ПЦР, т.е. реакцию на определение как GPV, так и GHPV, проводимую в одной пробирке. Для достижения поставленной цели были сформулированы несколько задач, основными из которых являлись следующие: 1) подобрать условия проведения амплификации (температурные режимы для термоциклера) и, 2) рассчитать и проверить опытным путем оптимальную концентрацию праймеров, что позволило бы избежать образования праймер-димеров.

Для проведения обеих реакций в “одной пробирке” для типирования как GPV, так и GHPV, использовали дуплексную ПЦР (ПЦР с двумя парами праймеров). При этом температура отжига составила от 50 °C до 60 °C с шагом в 1°C. Наиболее эффективная схема амплификации представлена на схеме (табл. 2).

Для достижения максимальной эффективности дуплекс

реакции использовали различные варианты концентраций праймеров – от 0,1 µM до 0,6 µM.

В результате исследований было показано, что оптимальной концентрацией праймеров в общем объеме реакционной смеси является 0,1 µM, что позволяет получить максимально «чистую» картинку (рис. 5).

Наличие на электрофореграмме фрагментов ДНК размером 539 и 144 п.н. указывает на присутствие в пробе геномов как парво-, так и полиомавируса. При этом исключена возможность перекрестных реакций, которые могут приводить к образованию ложноположительных результатов, что делает предлагаемый вариант дуплексной ПЦР перспективным для использования в диагностических исследованиях энтеритов гусей разной вирусной этиологии.

Выводы

1. В исследуемых образцах выявлены геномы как парвовируса, так и полиомавируса, что может быть причиной вирусного энтерита гусей.

2. Для проведения точной дифференциальной диагностики энтеритов гусей можно использовать метод полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

3. Использование разработанной дуплексной ПЦР позволяет быстро и эффективно, с минимальными затратами, определить наличие генома возбудителя (GPV + GHPV) в клиническом материале.

4. Для определения степени распространенности полиомавирусной инфекции в Украине необходимо провести мониторинг гусеводческих хозяйств на наличие данного возбудителя.

У статті детально охарактеризовано ентерити гусей різної вірусної етіології. Показано, що причиною прояву цього захворювання наряду з парвовірусом може бути й полімаріус. Проаналізовано особливості транскрипції генів обох вірусів. Детально описано застосування методу полімеразної ланцюгової реакції для детекції цих збудників у дослідних зразках. Розроблено метод дуплексної

ПЦР, який може бути використаний для одночасного виявлення в "одній пробірці" двох типів збудників вірусного ентериту гусей.

Ентерит гусей, парвовірус, поліомавірус, полімеразна ланцюгова реакція, дуплексна ПЦР

In the article is shown the detailed description of goose enteritis by different viral etiology. The analysis suggested that cause of goose enteritis may be

parvovirus as well as polyomavirus. The feature of the genome transcription mechanisms of both viruses is analyzed. The application of polymerase chain reaction for detection of parvovirus and polyomavirus is described in detail. The method of duplex PCR for parvovirus and polyomavirus detection is developed.

Goose enteritis, parvovirus, polyomavirus, polymerase chain reaction, duplex PCR

Література

1. Бондаренко А.Ф. Усовершенствование методов диагностики и профилактики вирусного энтерита гусей: автореф. дис. ... канд. вет. наук / А.Ф.Бондаренко – Краснодар, 1982. – 18 с.
2. Контримавичус Л.М. История изучения парвовирусной инфекции гусей в России / Л.М. Контримавичус // Ветеринария. – 2011. – №3. – С.61-62.
3. Профілактика вірусного ентериту гусей / П.С.Юрко, І.Ю.Безрукава, Г.В.Білецька [та ін.]. // Птахівництво: міжвід. тем. наук. зб. (Матеріали VII міжн конф. "Птахівництво-2011"). – Судак, 2011. – Вып. 67. – С.106 – 112.
4. Трефилов Б.Б. Разработка и внедрение средств диагностики и специфической профилактики наиболее опасных болезней птиц: автореф. дисс... доктора вет. наук. // С.-Петербург. – 2000. – 43 с.
5. Фадин В.С. Вирусный энтерит гусей / В.С.Фадин // Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных: сб. научных работ СибНИВИ. – Омск. – 1980. – Вып. 37. – С. 136 – 143.
6. A novel polyomavirus goose hemorrhagic polyomavirus is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese / J.L.Guerin, J.Gelfi, L.Dubois [et al.] // J. of Virol. – 2000. – V.74 (10). – P. 4523 – 4529.
7. Characterization of two novel polyomavirus of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes / R.Johne, W.Wittig, D.Fernandez-de-Luco [et al.] // J. Virol. – 2006. – V.80 (7). – P. 3523 – 3531.
8. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by multiply primed rolling-circle amplification of their genomes / J.Reimar, W.Witting, D.Fernandez-de-Luco [et al.] // J.Virol. – 2006. – V.80 (7). – P. 3523 – 3531.
9. Chu Ch.-Yen Genetic variation of the nucleocapsid genes of waterfowl parvovirus / Ch.-Yen Chu, M.-J. Pan, J.-T. Cheng // J. Vet. Med. Sci. – 2001. – V. 63(11). – P.1165 – 1170.
10. Diseases of poultry / editor-in-chief, Y.M. Saif. – 12th ed., Blackwell Publishing Ltd. – 2008. – 1409 p.
11. Epizootic occurrence of hemorrhagic nephritis enteritis infections of geese / V. Palya, E. Ivanics, R. Glavits [et al.] // Avian Pathol. – 2004. – V. 33(2). – P. 244 – 250.
12. Identification of sequence changes in live attenuated goose parvovirus vaccine strains developed in Asia and Europe / J.-H. Shien, Y.-S.Wang, C.-H. Chen [et al.] // Avian Pathol. – 2008. – V. 37 (5). – P. 499-505.
13. Isolation and molecular characterization of a new Muscovy duck parvovirus from Muscovy ducks in the USA / B.Poonia, P.A.Dunn, H.Lu [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – V. 35 (6). – P. 435 – 441.
14. John R. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family / R.Johne, H.Muller // J.Virol. – 2007. – V. 81 (21). – P. 11554 – 11559.
15. Pathology of goose hemorrhagic polyomavirus infection in goose embryos / S.Bernath, A.Farsang, A.Kovacs [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – V. 35(1). – P. 49 – 52.
16. Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus / C.Lacroux, O.Andreoletti, B.Payre [et al.] // Avian Pathol. – 2004. – V. 33 (3). – P. 351 – 358.
17. Phylogenetic analysis of Hungarian goose parvovirus isolates and vaccine strains / T.Tat6r-kis, T.Maty, B.Markos [et al.] // Avian Pathol. – 2004. – V. 33 (4). – P. 438 – 444.
18. Phylogenetic analysis of parvoviruses isolated in Taiwan from ducks and geese / P.C.Chang, J.H. Shien, M.S.Wang [et al.] // Avian Pathol. – 2000. – V. 29. – P. 45 – 49.
19. Recombinant subunit vaccine elicits protection against goose hemorrhagic nephritis and enteritis / T. Mato, Z. Penzes, P. Rueda [et al.] // Avian Pathol. – 2009. – V. 38 (3). – P. 233 – 237.
20. Reimar J. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family / J.Reimar, M.Hermann // J.Virol. – 2007. – V. 81 (21). – P. 11554 – 11559.
21. Touchdown PCR for the detection of waterfowl parvoviruses / G.Wozniakowski, W.Kozdrun, E.Samorek-Salamonowicz [et al.] // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2009. – V. 53. – P. 3 – 7.
22. Voyles B.A. The biology of viruses / B.A. Voyles. – N.Y.: McGraw Hill, 2003. – 416 p.