

**Заключение.** 1. Коммерческие медицинские полибактериофаги проявляли свою литическую активность в 11-61% с возбудителями от животных и из кормов.

2. Поливалентные фагопрепараты также способны защищать белых мышей от гибели, но только при инфицировании гомологичной культурой, от которой получен фаг.

#### Список литературы

1. Больных, В.Т. Псевдомоноз животных и их профилактика / В.Т. Больных, Е.А. Кирьянов, Н.В. Больных // Под ред. Е.А. Кирьянова. – Владивосток. – Дальневосточное книжн. издат. – 1987. – С. 37-43.
2. Васильев, А.К. «Псевдомоноз свиней в Краснодарском крае. Автореферат кандидатской диссертации. – Краснодар. – 2003.
3. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению псевдомоноза сельскохозяйственных животных, М. – 2003.

### SPECIFIC THERAPY OF ANIMALS BY BACTERIOPHAGES AT PSEUDOMONOSIS

Prutsakov S.V., Bolotskiy I.A., Sementsov V.I., Vasilyev A.K.  
Krasnodar Scientific Research Veterinary Institute, Russia

*Data on effective use of various preparations and specific bacteriophages on laboratory animals and pig at pseudomonosstorage is presented in the paper.*

УДК 619:578.831.1:616-079.4

### ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, ВЫЯВЛЕННЫЙ В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ И СИНАНТРОПНЫХ ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2008 ГОДУ

Пчёлкина И.П., Колосов С.Н., Манин Т.Б., Чвала И.А., Андриясов А.В.,  
Старов С.К., Дрыгин В.В., Борисов А.В.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

*Представлены результаты выявления вируса ньюкаслской болезни (ВНБ) из 1368 проб, отобранных в ходе мониторинговых мероприятий от диких и синантропных птиц в различных регионах России в 2008 году. Методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием фрагмента гена F было выявлено 29 изолятов ВНБ. Показано, что на территории России встречались низковирулентные варианты ВНБ генотипов I и II, а также высоковирулентные варианты ВНБ генотипа VIb «голубиной» линии VIb/2 и генотипа VIIд.*

Ньюкаслская болезнь (НБ) относится к особо опасным болезням птиц. Возбудителем НБ является парамиксовирус птиц серотипа 1 (APMV-1), принадлежащий одному из девяти известных серотипов парамиксовирусов птиц. Все APMV объединены в род *Avulovirus* семейства *Paramyxoviridae* порядка *Mononegavirales* [7].

Ньюкаслская болезнь в основном поражает кур. Заболевание у кур может значительно варьировать по своей тяжести от бессимптомной инфекции до тяжелого системного заболевания, приводящего к высокой смертности [4]. Тяжесть заболевания непосредственно связана с вирулентностью штамма вируса. Некоторые низковирулентные штаммы широко используются в ветеринарной практике в качестве живых вакцин.

Успех борьбы с болезнью зависит от своевременной и полной диагностики. Использование комплекса молекулярно-биологических методов позволяет быстро и эффективно решать задачи лабораторной диагностики НБ: выявления вируса и его характеристики в отношении вирулентности и групповой принадлежности.

Основным молекулярно-генетическим маркером вирулентности ВНБ является аминокислотная последовательность сайта расщепления белка  $F_0$  [4]. Критерий структуры сайта расщепления белка  $F_0$  в 1999 году был признан МЭБ в качестве альтернативы определению вирулентности в опытах на животных.

Вирус ньюкаслской болезни обладает высоким уровнем генетического разнообразия [2, 5, 6, 8], хотя в серологическом отношении считается, что все штаммы

и изоляты этого патогена принадлежат одному серотипу. В настоящее время известны до 10 генотипов и большое количество генетических групп вируса, существенно отличающиеся по патогенности, географическому распространению и спектру поражаемых видов птиц.

Несмотря на то, что в настоящее время имеются эффективные вакцины против ВНБ, эта инфекция остается одной из актуальных ветеринарных проблем современности. Чувствительными к ВНБ в результате естественного или экспериментального заражения являются птицы более чем 250 видов. У некоторых видов птиц, таких как: дикие утки, бакланы, голуби наблюдается устойчивая циркуляция вируса в течение многих лет [4]. Естественным резервуаром ВНБ являются дикие птицы как водного и околводного, так и наземного экологических комплексов. Из популяций диких пернатых ВНБ проникает в среду домашних птиц [1]. В связи с этим изучение циркуляции ВНБ среди диких и синантропных птиц имеет практическое значение. Целью настоящего исследования было проведение мониторинга ВНБ среди диких и синантропных птиц на территории России.

**Материалы и методы.** В исследованиях использованы пробы, отобранные от синантропных и диких птиц разных видов в течение 2008 года. Большая часть проб была отобрана в ходе мониторинговых мероприятий в популяции диких птиц в различных регионах России. Часть проб поступила от государственных и производственных ветеринарных служб для подтверждения диагноза на НБ или для первичного исследования.

Все пробы исследовались в ОТ-ПЦР на наличие генома ВНБ. РНК выделяли, используя наборы производства ООО БиоКом (Россия, г. Москва). Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной методике [2] в программируемом амплификаторе MiniCycler (MJ Research Inc, США) с использованием ферментов и реактивов производства Promega (США), Invitrogen (США). Реакцию секвенирования проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей полученных фрагментов ДНК проводили, используя пакеты прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3, MEGA 3.1.

Выделение вируса проводили на 9-суточных эмбрионах СПФ кур (КЭ). 10% суспензию органов вводили в аллантаоисную полость в объеме 0,2 см<sup>3</sup>/эмбрион. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубировали при 37 °С в течение 96 ч. КЭ, погибшие после 48 и более часов инкубации, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) с целью проведения дальнейших исследований.

**Результаты работы.** В 2008 году методом ОТ-ПЦР исследовано 1368 образцов от диких и синантропных птиц из 18 регионов Российской Федерации. Геном вируса ньюкаслской болезни был выявлен в 29 пробах (табл. 1). На куриных эмбрионах было выделено 14 изолятов (от – голубей 10, от диких уток разных видов – 4).

**Таблица 1** – Характеристика изолятов ВНБ 2008 г

Название изолята	Место сбора материала	Вид птицы	Сайт расщепл.	Генотип
1	2	3	4	5
Pi/Rus/Tver/0067/08	Тверская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Tver/0068/08	Тверская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Tver/0069/08	Тверская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Komi-Uhta/0070/08	Р. Коми	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Komi/0073/08	Р. Коми	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Tula/0500/08	Тульская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Tula/0529/08	Тульская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Kostroma/0318/08	Костромская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Murmansk/1475/08	Мурманская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Pi/Rus/Murmansk/1475/08	Мурманская обл.	голубь	KRQKR-F	VI/b2
Goose/Rus/Murmansk/1498/08	Мурманская обл.	гусь	RRQKR-F	VII/d

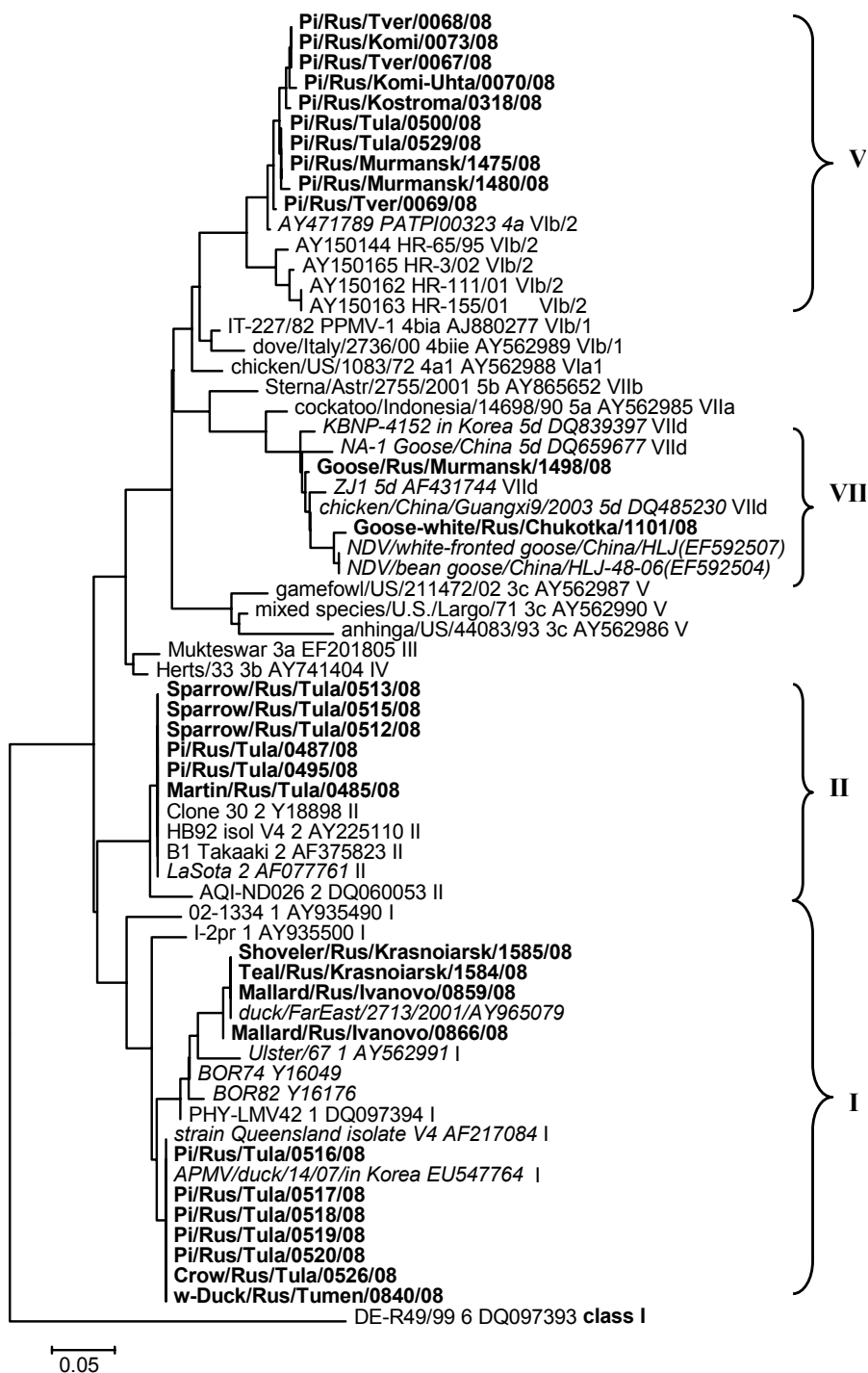
1	2	3	4	5
Goose-white/Rus/ Chukotka/1101/08	Чукотский АО	гусь бе- лый	RRQKR-F	VII/d
Martin/Rus/Tula/0485/08	Тульская обл.	ласточка	GRQGR-L	II
Pi/Rus/Tula/0487/08	Тульская обл.	голубь	GRQGR-L	II
Pi/Rus/Tula/0495/08	Тульская обл.	голубь	GRQGR-L	II
Sparrow/Rus/Tula/0512/08	Тульская обл.	воробей	GRQGR-L	II
Sparrow/Rus/Tula/0513/08	Тульская обл.	воробей	GRQGR-L	II
Sparrow/Rus/Tula/0515/08	Тульская обл.	воробей	GRQGR-L	II
Pi/Rus/Tula/0516/08	Тульская обл.	голубь	GKQGR-L	I
Pi/Rus/Tula/0517/08	Тульская обл.	голубь	GKQGR-L	I
Pi/Rus/Tula/0518/08	Тульская обл.	голубь	GKQGR-L	I
Pi/Rus/Tula/0519/08	Тульская обл.	голубь	GKQGR-L	I
Pi/Rus/Tula/0520/08	Тульская обл.	голубь	GKQGR-L	I
Crow/Rus/Tula/0526/08	Тульская обл.	ворона	GKQGR-L	I
w-Duck/Rus/Tumen/0840/08	Тюменская обл.	утка серая	GKQGR-L	I
Mallard/Rus/Ivanovo/0859/08	Ивановская обл.	кряква	GKQGR-L	I
Mallard/Rus/Ivanovo/0866/08	Ивановская обл.	кряква	GKQGR-L	I
Teal/Rus/Krasnoyarsk/1584/08	Красноярский край	чирок- свистунок	GKQGR-L	I
Shoveler/Rus/ Krasnoyarsk/1585/08	Красноярский край	широко- носка	GKQGR-L	I

Двенадцать изолятов были высоковирулентными по сайту расщепления белка  $F_0$ . Из них десять изолятов, выявленных от голубей, имели сайт расщепления белка  $F_0$   $^{12}$ KRQKR-F $^{17}$ . Два изолята, выявленных от диких гусей, обладали сайтом расщепления  $^{12}$ RRQKR-F $^{17}$ . 15 изолятов были низковирулентными по сайту расщепления белка  $F_0$ . Из низковирулентных выявленных от голубей, воробьев и ласточки 6 изолятов были с сайтом расщепления  $^{12}$ GRQGR-L $^{17}$ , а 11 изолятов, выявленных от диких уток разных видов, голубей и вороны, с сайтом расщепления белка  $F_0$   $^{12}$ GKQGR-L $^{17}$  (табл.1).

Филогенетический анализ с использованием последовательностей, опубликованных в GenBank, позволил провести генотипирование исследуемых изолятов (рис.1). Филогенетическое дерево дает возможность визуально оценить отношения между различными группами вируса. Генотипы на рисунке приведены по E.W. Aldous и др. [2, 3] (арабские цифры) и B. Lomniczi и др. [6], J. Herczeg и др. [5] и др. (римские цифры).

Выявленные в настоящем исследовании низковирулентные изоляты принадлежали генотипам I и II. Шесть изолятов, выделенных от синантропных птиц (голуби, воробьи, ласточка) из Тульской области, принадлежали генотипу II и были по изученному участку нуклеотидной последовательности гена F идентичны используемому в качестве живых вакцин штаммам La-Sota, B1 и clone 30. Выделение этих изолятов от синантропных птиц указывает на неконтролируемое распространение вакцинных штаммов в невакцинированных популяциях (рис.1).

Еще 11 изолятов с сайтом расщепления белка  $F_0$ , характерным для низковирулентных штаммов ВНБ, принадлежали генотипу I. Четыре из них, выделенных из проб от диких уток, полученных из Ивановской области и Красноярского края, принадлежали генетической линии, циркулирующей в популяциях диких птиц [1] и были близки по изученному участку последовательности гена F лентогенному штамму Ulster/67. Шесть других изолятов, выделенных из проб от голубей, полученных из Тульской области и одной из проб от дикой утки, полученных из Тюменской области, совпадали по фрагменту последовательности гена F с лентогенным штаммом Queensland V4 (рис.1).



**Рис.1** Филограмма, демонстрирующая положение изолятов ВНБ по отношению к существующим генотипам. Получена методом NJ в программе MEGA 3.1. при анализе последовательности фрагмента гена F (217-374) длиной 158 н.

В генотипе VI выделяют не менее пяти линий, в том числе линию VIb, вызвавшую продолжающуюся с начала 80-х гг. панзоотию НБ среди голубей [3, 8].

Десять изолятов, выявленных от голубей, принадлежали относительно малоизученной «голубиной» линии VIb/2. Ранее эта группа была описана по пяти изолятам ВНБ из Хорватии и Австрии [2, 3, 8]. Имеются данные, что вирусы этой линии вызывают у голубей тяжелое заболевание с летальностью до 100%. Эти факты свидетельствуют о высокой адаптивности вирусов этой группы к голубям, что объединяет их с классической «голубиной» линией VIb/1 [3, 8].

Два изолята, выявленных из проб от диких гусей из Мурманской области и с острова Врангель Чукотского АО, были отнесены к генотипу VIId и имели близкие аналоги среди изолятов, выделенных в Китае, где эта линия широко распространена. Вирусы ньюкаслской болезни генотипа VIId отличаются крайне высокой вирулентностью для кур. Их присутствие в популяциях диких перелетных птиц указывает на возможность распространения высоковирулентных линий ВНБ.

**Выводы.** В результате проведенных исследований установлено, что в 2008 году на территории России циркулировали низко- и высоковирулентные варианты ВНБ. В целом полученные данные свидетельствуют о высоком разнообразии популяции вируса ньюкаслской болезни на территории России. Среди факторов, влияющих на существующий феномен, можно выделить, по-видимому, преимущественную адаптацию вируса к отдельным видам птиц, в частности, к голубям, характерную для генотипа VIb/2, и постоянную интродукцию извне новых генетических форм патогена, ярко проявляющуюся в случае изолятов генотипа VIId.

Остальные группы в основном представлены низковирулентными изолятами от диких и синантропных птиц генотипов I и II.

Также, по нашему мнению, представляют интерес изоляты НБ, выделенные от диких уток. Они отнесены к генотипу I, к которому принадлежат штаммы вируса ньюкаслской болезни и многочисленные изоляты, полученные по всему миру от диких водоплавающих птиц, которые представляют естественный резервуар для АPMV-1 этого генотипа. Изоляты вируса НБ, выявленные от синантропных птиц II генотипа, демонстрируют неконтролируемое распространение «вакцинных» штаммов в невакцинированных популяциях.

Таким образом, проведенные нами исследования по изучению циркуляции вируса ньюкаслской болезни среди диких и синантропных птиц в России имеют как глубокое теоретическое, так и практическое значение.

#### Список литературы

1. Шелканов, М.Ю., Ананьев, В.Ю., Львов, Д.Н. и др. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края в 2003-2006 гг. // *Вопр. вирусол.* – 2007. – № 5. – С. 37-48.
2. Aldous, E.W., Munn, J.K. et al. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis a partial nucleotide sequence of fusion protein gene // *Avian Pathol.* – 2003. – Vol. 32, N 3. – P. 239-257.
3. Aldous, E.W., Fuller, C.M. et al. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons // *Avian Pathol.* – 2004. – Vol. 33, N 2. – P.258-269.
4. Alexander, D.J., Calnek, B.W. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections // *Diseases of Poultry.* – 10<sup>th</sup> ed. – Ames, Iowa, 1997. – P. – 541-570.
5. Herczeg, J., Wehmann, E., Bragg, R.R. et al. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one(VIIb) of which reached Southern Europe // *Arch. Virol.* – 1999. – Vol. 144. – P.2087-2099.
6. Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J. et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) // *Arch. Virol.* – 1998. – Vol. 143. – P. 49-64.
7. Mayo, M. A. Virus Taxonomy-Houston 2002 // *Arch. Virol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 1071-1079.
8. Ujvari, D., Wehmann, E., Kaleta, E. F. et al. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission // *Virus Research.* – 2003. – Vol. 96. – P. 63-73.

#### NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATED IN WILD AND SYNANTHROPIC BIRD POPULATIONS IN THE TERRITORY OF RUSSIA IN 2008

Pchelkina I.P., Kolosov S.N., Manin T.B., Chvala I.A., Andriyasov A.V., Starov S.K., Drygin V.V., Borisov A.V.

FGI «Federal Centre for Animal Health», Vladimir, Russia

*The results of Newcastle disease virus detection from 1,368 samples collected from wild and synanthropic birds during monitoring conducted in the different regions of Russia in 2008 are*

*presented. Twenty-nine isolates of Newcastle disease virus were recovered by OT-PCR followed by F gene fragment sequencing. It was shown that low virulent variants of Newcastle disease virus of genotypes I and II, as well as highly virulent variants of Newcastle disease virus of VIb genotype of «pigeon» line VIb2 and genotype VIId occurred in the territory of Russia.*

УДК 543.068:577.113+535.394

## **РАСПОЗНАВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОМЕТРА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА «ПЛАЗМОН ППР-4М»**

Рачков А.Э.<sup>1</sup>, Холодова Ю.В.<sup>2</sup>, Телегеев Г.Д.<sup>1</sup>, Солдаткин А.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

<sup>2</sup> Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко

*Для выявления возбудителей различных заболеваний в качестве эффективного способа их диагностики и профилактики предложен биосенсорный метод с использованием спектрометра поверхностного плазмонного резонанса (ППР) «Плазмон ППР-4м», разработанного украинскими исследователями. Иммуобилизация одноцепочечных олигонуклеотидов определенной последовательности на сенсорной поверхности такого прибора создает возможность их взаимодействия на этой поверхности с другими олигонуклеотидами в исследуемых образцах. Это вызывает прямой (без применения молекулярных меток) отклик сенсора в режиме реального времени. При введении исследуемых олигонуклеотидов в измерительную ячейку были получены биосенсорные отклики, величина которых соответствует степени их комплементарности к иммобилизованному олигонуклеотиду. Таким образом, была показана возможность распознавания олигонуклеотидов с помощью предложенного биосенсорного метода.*

Достижения современной молекулярной биологии, особенно в области расшифровки геномов различных организмов (от вирусов и бактерий до млекопитающих и человека) открывают огромные возможности для изучения и выявления возбудителей различных заболеваний, разработки и использования эффективных способов их мониторинга, диагностики и профилактики. Для этих целей во многих случаях могли бы подойти такие средства современной аналитической биотехнологии как биосенсоры. Их конструктивной особенностью является соединение биоселективного элемента, который специфично реагирует с искомым аналитом, и физического преобразователя, который трансформирует результат биологического процесса в удобный для дальнейшей обработки и характеристики электрический сигнал. Если для формирования биоселективных элементов биосенсоров на поверхности физического преобразователя иммобилизуют одноцепочечные фрагменты ДНК и процесс гибридизации иммобилизированной пробы ДНК с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот, находящихся в анализируемом образце, является основой их селективности, то такие биосенсоры называются аффинными биосенсорами для детектирования специфических последовательностей нуклеиновых кислот или, коротко, ДНК-биосенсорами [1,2].

Все методические подходы для детектирования специфических последовательностей нуклеиновых кислот можно разделить на использующие молекулярные метки (флуоресцентные, ферментные и т.п.) и на прямые методы без использования молекулярных меток. Прямые методы значительно уменьшают затраты времени, материалов и финансовых средств. Кроме того они свободны от таких нежелательных эффектов, связанных с молекулярными метками, как их нестабильность и влияние на структуру и биологическую активность меченых биомолекул [3]. Одним из таких прямых подходов является спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [4]. Ряд фирм занимаются разработками аналитического оборудования, основанного на использовании этого явления. Наибольшую известность приобрели спектрометры ППР шведской компании "Biacore International AB" (недавно