

УДК: 619:616.98:578.835.1:636.22/.28

С.А. Кочетков, М.А. Шибаев, С.А. Чупин, Л.Б. Прохвятилова, В.А. Мищенко
(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» г. Владимир, Россия)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЭНТЕРОВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ключевые слова: энтеровирусы, КРС, гетерогенность, превалентность.

Введение

Согласно имеющимся данным, многие исследователи в различных странах часто выделяли энтеровирусы от телят с поражением респираторных органов и желудочно-кишечного тракта. Кроме того, вирус обнаруживается у взрослых животных при нарушении функции воспроизводства. Выделяют его и от клинически здоровых животных (1, 3, 8).

Поскольку чаще всего болезнь протекает в латентной форме, для постановки диагноза необходимо применение лабораторных методов выявления возбудителя. С этой целью нами разработан и успешно применяется метод полимеразной цепной реакции, позволяющий обнаружить геном возбудителя в исследуемом материале.

В связи с тем, что подобные работы ранее не проводились, нашей целью явилось изучение распространенности энтеровируса крупного рогатого скота на территории Центрального федерального округа РФ с помощью исследования репрезентативных образцов, отобранных в животноводческих хозяйствах данного региона. Также было проведено изучение генетического разнообразия выявленных российских изолятов, поскольку по данным зарубежных исследователей, энтеровирус характеризуется высокой генетической гетерогенностью (6).

Материалы и методы

Вирусный материал. Материалом для исследования служили мазки из прямой кишки от телят в возрасте от 15 дней до 7 месяцев. Отбор образцов для анализа осуществляли с использованием одноразовых

транспортных систем, состоящих из стерильной пластиковой пробирки и аппликатора с тампоном (COPAN, Италия) с добавлением в качестве транспортной среды стерильного физиологического раствора. Всего было отобрано 390 образцов.

Суммарную РНК из отобранных проб выделяли с использованием универсального набора реагентов для пробоподготовки (ООО «Компания Биоком», Россия) в соответствии с инструкцией к набору.

Реакция обратной транскрипции. В пробирку помещали 3 мкл раствора РНК и добавляли реакционную смесь, содержащую 5 мкл 5х буфера AMV RT для обратной транскрипции, 2 мкл 10 mM dNTP (Fermentas, Литва), по 10 пмоль каждого праймера (EN1, EN5), 2,5 ед. AMV обратной транскриптазы (Promega, США) и деионизированную воду до конечного объема 25 мкл. Сверху наслаивали 20 мкл минерального масла. Инкубировали при температуре 42°C в течение 40 минут.

Полимеразная цепная реакция. Реакцию осуществляли в два этапа («nested» ПЦР). Для проведения первой реакции в пробирку объемом 0,2 мл вносили 3 мкл продуктов реакции обратной транскрипции, по 10 пмоль праймеров EN1 и EN5 (Табл. 1), 2,5 мкл 10х ПЦР буфера (Promega, США), 2 мкл 25 mM раствора MgCl₂ (Promega, США), 1 мкл 10 mM dNTP (Fermentas, Литва), 2 ед. Taq-полимеразы (Promega, США), воду до конечного объема 25 мкл, сверху наслаивали 20 мкл минерального масла. Далее проводили 30 циклов амплификации при следующих режимах: 94°C – 30 с, 53°C – 30 с и 72°C –

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров для выявления энтеровируса КРС

Наименование	Последовательность нуклеотидов	Локализация праймеров*
EN1	5'- GTA CCT TTG TAC GCCTGT TTT -3'	66-86
EN2	5'- TCA AGC ACT TCT GTT TCC CC -3'	270-289
EN4	5'- GGA TTA GCA GCA TTC ACG GC -3'	528-547
EN5	5'- GTC TGT TCC GCC TCC AAC TT -3'	598-617

*соответствует нуклеотидной последовательности штамма энтеровируса K2577 (номер доступа в GenBank AF123432)

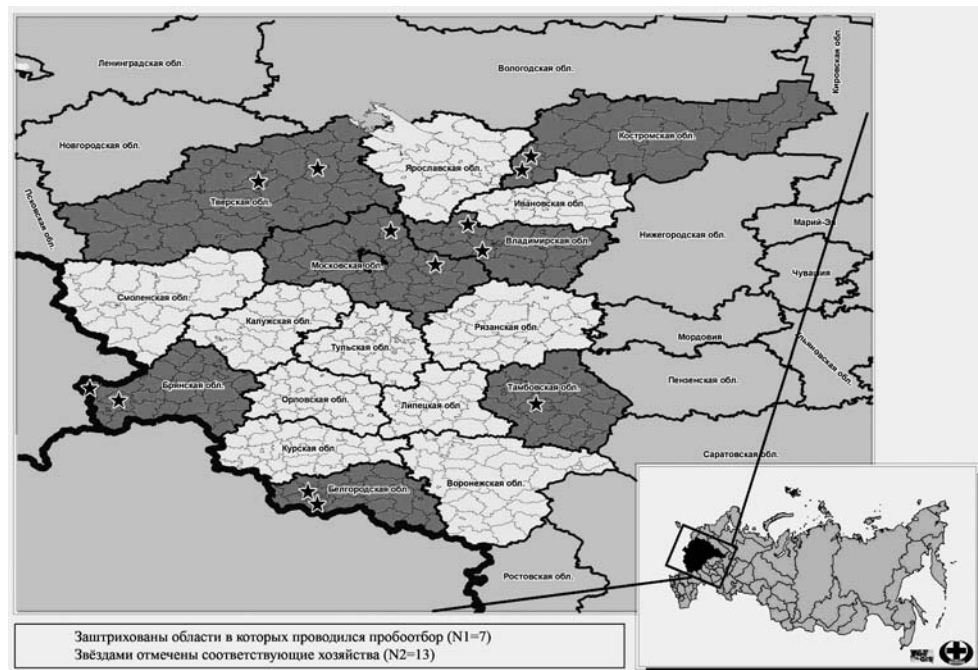


Рис. 1. Картография регионов отбора проб

30 с. Реакционная смесь для второй реакции аналогична первой за исключением праймеров EN2 и EN4. Матрицей служили продукты первой реакции. Далее проводили 25 циклов амплификации при следующих режимах: 94°C – 30 с, 57°C – 30 с и 72°C – 30 с.

ПЦР проводили на амплификаторе PTC-100 (MJ Research, США). Синтез праймеров – ЗАО «Синтол» (г. Москва).

Анализ продуктов реакции, полученных в ПЦР, определяли, сравнивая их электрофоретическую подвижность в 2% агарозном геле с маркером молекулярных весов. Наличие в геле фрагмента ДНК размером 279 пар нуклеотидов свидетельствовало о присутствии энтеровируса КРС в исследуемом материале.

Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов «Wizard® PCR Preps DNA Purification System» (Promega, США) согласно методике производителя.

Секвенирование. Продукты ПЦР секвенировали с использованием праймеров EN2 и EN4 на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных результатов. Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированного участка генома энтеровируса КРС проводили при помощи программы BioEdit version 7.0.1. Филогенетический анализ проводили с применением алгоритма NJ (в том числе с использованием метода численного ресэмплинга «бутстреп») в

реализации пакета MEGA, версия 4.0.

Результаты и обсуждение

Для изучения распространенности энтеровируса КРС в Центральном федеральном округе (ЦФО) пробы отбирали в ряде хозяйств (n=13) семи областей ЦФО (Московская, Владимирская, Тамбовская, Брянская, Белгородская, Тверская, Костромская). Выбор хозяйств был сделан квазислучайно, согласно предъявляемым требованиям минимальной территориальной репрезентативности выборки в географически удаленных друг от друга точках. Исходя из 95% уровня вероятности и 10% превалентности болезни в популяции (минимальная превалентность), для бесконечно большой популяции, было отобрано по 30 проб из каждого хозяйства. Для непосредственного выбора конечной единицы (животное) применяли простой случайный выбор без возвращения единицы внутри кластера (2).

Целью нашего исследования являлось изучение широты распространения энтеровируса в популяции КРС Центрального федерального округа РФ. Обследование 13 стад расположенных в 7 регионах страны, входящих в ЦФО (Рис. 1), показало, что стадная превалентность инфицирования энтеровирусом КРС телят весьма высока и составляет 61,5% (положительные пробы выявлены в 8 из 13 обследованных хозяйств). Индивидуальная превалентность среди всех обследованных животных составила 11,5% (положительные результа-

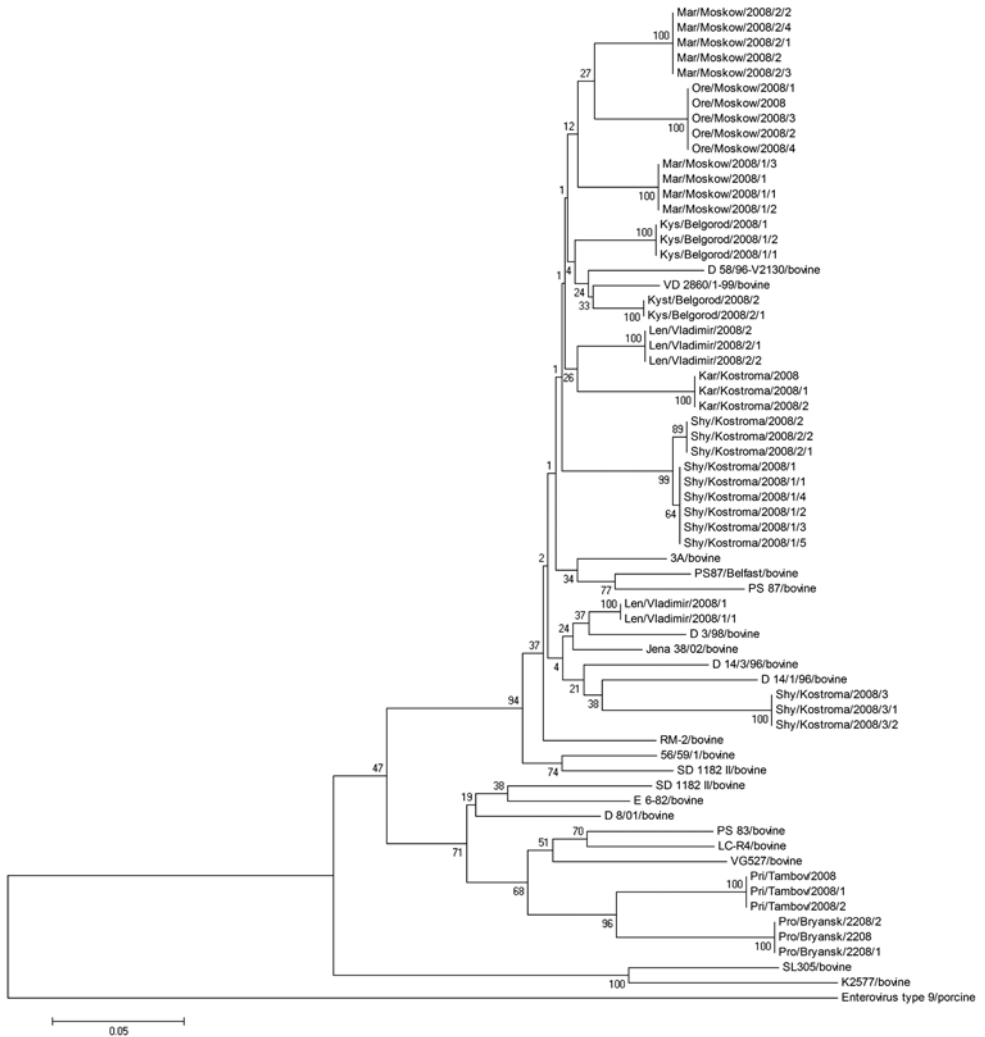


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей энтеровируса КРС с выявленными нами изолятами фрагмента генома, соответствующего амплифицированному участку, длиной 279 п.н. (270...547 п.н.). Нумерация нуклеотидов соответствует нуклеотидной последовательности штамма энтеровируса КРС K2577 (номер доступа в GenBank AF123432)

ты ПЦР установлены в 45 из 390 проб). В стадах, где был выявлен энтеровирус КРС, превалентность составила 18,8%. Стоит заметить, что зарубежные авторы также отмечают повсеместное распространение энтеровирусов КРС. При этом, по некоторым данным, в отдельных регионах США и Испании, с высокой концентрацией животноводческих ферм, индивидуальная превалентность энтеровируса КРС составляет 76% – 78%, а стадная 100%. При этом, распространенность энтеровируса КРС была пропорциональна интенсивности производства в хозяйствах (6, 7).

Для 45 изолятов, выявленных в настоящем исследовании, были определены нуклеотидные последовательности ампли-

фицированных фрагментов. Сравнительный анализ данных последовательностей показал наличие как идентичных, так и гетерогенных изолятов в пределах одного хозяйства. Идентичных последовательностей в разных хозяйствах обнаружено не было. Следует отметить, что ни один из изолятов, выделенных из хозяйств на территории РФ, не показал 100 процентной гомологии с ранее опубликованными последовательностями энтеровирусов.

Филогенетический анализ выявленных изолятов и нуклеотидных последовательностей, опубликованных в GenBank, показал, что энтеровирусы КРС, циркулирующие на территории Российской Федерации, характеризуются высокой генетической

гетерогенностью (Рис. 2). Генетическая гомология между данными изолятами варьировала от 74 до 99 процентов. Столь высокая гетерогенность изолятов так же описывалась зарубежными авторами (6).

Не менее важным и эпизоотически значимым фактом нашего исследования было то, что в 4 из 8 хозяйств, в которых выявляли присутствие энтеровируса КРС, регистрировали одновременное присутствие нескольких различных генетических форм изучаемого вируса. При этом, в отдельных стадах, уровень различий между изолятами составлял 13%. Эти результаты возможно указывают на существование популяции близкородственных, но не идентичных энтерови-

РЕЗЮМЕ

Данное исследование направлено на выявление и изучение генетического разнообразия энтеровирусов КРС на территории Центрального федерального округа РФ. Обнаружение вирусных агентов проводили, используя полимеразную цепную реакцию, мишенью для которой служила 5'-нетранслируемая область генома энтеровируса КРС.

Проведенное исследование показало широкое распространение данного вируса среди стад ЦФО. Анализ выявленных изолятов показал, что энтеровирусы КРС, циркулирующие на территории РФ, характеризуются высокой генетической гетерогенностью. Так же стоит отметить выявление нескольких различных генетических форм энтеровируса КРС внутри одного стада.

SUMMARY

The study was aimed at the detection and examination of genetic diversity of bovine enteroviruses in the territory of the Central Federal Okrug of the Russian Federation. Polymerase chain reaction targeted to 5'-untranslated region of bovine enterovirus genome was used for the detection. Analysis of the recovered isolates showed that bovine enteroviruses circulating in the territory of the Russian Federation were characterized by high genetic heterogeneity and prevalence among herds in the Central Federal Okrug.

Литература

1. Гафаров, Х. З., Иванов, А. В., Непоклонов, Е. А., Равидов, А. З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят. // Казань: изд-во «Фэн». – 2002. – С. 93-101
2. Дудников, С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики / С.А. Дудников. - Владимир: Демиург, 2004. - 460 с.
3. Самуйленко А.Я., Соловьева Б.В., Непоклонов Е.А., Воронина Е.С. Инфекционная патология животных. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 525-534 с.
4. Eigen M. Viral quasispecies. // *Sci Am.* – 1993. – V.269(1). – P.42–9.
5. Holland J.J., De La Torre J.C., Steinhauer D.A. // RNA virus populations as quasispecies. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 1992. – V.176. – P. 1–20.
6. Jiménez-Clavero M. A., Escribano-Romero E., Mansilla C., et al. Survey of Bovine Enterovirus in Biological and Environmental Samples by a Highly Sensitive Real-Time Reverse Transcription-PCR // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – V.71(7). – P. 3536–3543.
7. Ley V., Higgins J., Fayer R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – V.68(7). – P. 3455–3461.
8. Zell R., Krumbholz A., Dauber M. et al. Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V.87. – P. 375–385

УДК: 619:618.19.002

Н.Д. Кухтын, Я.Й. Крижановский, И.П. Даниленко,

Ю.Б. Перкий, Н.Ф. Моткалюк, Ж.Г. Свєргун

(Тернопольская опытная станция Института ветеринарной медицины Украины)

ВЫМЯ КОРОВ КАК СЛОЖНАЯ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Ключевые слова: вымя, экосистема, нормомикробиоценоз.

Технический прогресс предоставил человечеству возможности влиять на природу. Учене с оптимизмом предрекали благоприятные результаты вмешательства чело-

вещей в форме квазивидов (quasispecies) (4, 5).

Выводы

Проведенное исследование показало, что энтеровирусы КРС, циркулирующие на территории РФ, характеризуются высокой генетической гетерогенностью, а превалентность данного вируса среди стад ЦФО составила 61,5%. Индивидуальная превалентность среди всех обследованных животных составила 11,5%. В стадах, где был выявлен энтеровирус КРС, превалентность составила 18,8%.

Эпизоотически значимым является факт одновременного присутствия нескольких различных генетических форм энтеровируса КРС внутри одного стада.

века в климатические процессы и ждали, когда же, наконец, можно будет управлять природой и по желанию менять климат [1].

Но технический прогресс оказался при-