

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОТ-ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ГЕНОМА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ В ОРГАНАХ И КРОВИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК****Е.Г. НИКИТИНА, Н.И. САЛЬНИКОВ, С.А. КАТОРКИН, Е.А. БАЛАШОВА,
С.Ж. ЦЫБАНОВ, Д.В. КОЛБАСОВ, А.В. ЛУНИЦИН**

Болезнь Акабане — трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного и мелкого рогатого скота, вызываемая вирусом серогруппы *Simbu* семейства *Bunyaviridae*. Болезнь наносит большой экономический ущерб, причиняемый животноводческой отрасли в результате эпизоотий, поскольку при заболевании происходят прямые потери от гибели животных, снижения продуктивности домашних жвачных животных и нарушения воспроизводительной функции у больных животных. Болезнь протекает в виде эпизоотии, характеризуется географической приуроченностью, выраженной сезонностью (август—октябрь, февраль) и периодичностью возникновения с интервалом в несколько лет. Для накопления вируса Акабане обычно используют 1-2-суточных белых мышей-сосунов, которые представляют собой наиболее чувствительную систему для изоляции всех буньявирусов. Ранее во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВиМ) была разработана тест-система для выявления РНК вируса болезни Акабане на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени и подтверждена ее эффективность при обнаружении вируса у экспериментально зараженных мышей и в инфицированных культурах клеток. Однако представляло интерес, с одной стороны, оценить возможности предложенной тест-системы при расширении круга исследуемых объектов, с другой — найти новые модели для изучения и накопления вируса. В настоящей работе мы использовали здоровых морских свинок ($n = 20$, масса каждая особи — по 400 г). Эксперимент по заражению морских свинок проводили в трех повторностях. Животных заражали концентрированным культуральным материалом, содержащим вирус болезни Акабане (штамм В8935) с инфекционной активностью $7,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Начиная со 2-х по 6-е сут после заражения, у всех животных ежедневно отбирали пробы крови. В пробах крови от всех морских свинок геном вируса болезни Акабане был обнаружен только на 4-е сут после заражения. Одна особь пала на 1-е сут после заражения (возможно, вследствие неспецифической реакции, так как выявить геном вируса болезни Акабане при исследовании образцов органов, взятых *post mortem* у этого животного, не удалось). Дополнительно для получения биоматериала на 4-е сут после заражения у нескольких морских свинок были отобраны органы (мозг, легкое, почки, лимфоузел, сердце), в тканях которых также обнаружили вирус Акабане. Этим подтверждается эффективность разработанной тест-системы при диагностике вируса болезни Акабане и возможность использовать для его накопления еще один модельный объект — морских свинок.

Ключевые слова: болезнь Акабане, вирус болезни Акабане, морские свинки, комары *Culicoides*, ОТ-ПЦР, тест-система.

Болезнь Акабане — трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного и мелкого рогатого скота, вызываемая вирусом серогруппы *Simbu* семейства *Bunyaviridae*. Болезнь наносит большой экономический ущерб, причиняемый животноводческой отрасли в результате эпизоотий, поскольку при заболевании происходят прямые потери от гибели животных, снижения продуктивности домашних жвачных животных и нарушения воспроизводительной функции у больных особей (1-3). Ареал этого заболевания установлен не окончательно. С 1959 года его регистрируют в Японии, с 1972 года — в Австралии и Новом Южном Уэльсе, с 1969-1970 годов — в Израиле, Корее и Кении (4, 5). Болезнь протекает в виде эпизоотии, характеризуется географической приуроченностью, выраженной сезонностью (август—октябрь, февраль) и периодичностью возникновения с интервалом в несколько лет (1, 2, 6). Вирус переносится кровососущими насекомыми, обычно мелкими комарами рода *Culicoides*: в Африке — *Culicoides milne* и *Culicoides imicola*, в Японии — *Culicoides oxystoma*, в Австралии — *Culicoides brevitarsis* и *Culicoides wadei*. Также вирус выделяли

от москитов *Aedes vexans* и *Culex triaeniorhynchus* в Японии (6, 7) и *Anopheles fenestus* в Кении (2-4, 8-10).

В настоящее время актуальность проблемы этой инфекции возрастает. В специальной литературе в последние годы представлены работы по выявлению распространения вируса в разных странах (11-13), изучению его генетических свойств и патогенности (14). В ряде лабораторий выполняются серологические и иммунологические исследования (15, 16), имеются также сообщения о разработках вакцин (17, 18). В этой связи специальное внимание уделяется методам диагностики и индикации вируса (19, 20).

Для диагностики болезни Акабана используют метод флюоресцирующих антител, реакции нейтрализации, задержки гемагглютинации, связывания комплемента, диффузионной преципитации, твердофазный иммуноферментный анализ. Материалом для выделения вируса болезни Акабана служат пробы различных органов и тканей от плодов абортировавших животных (мозг, лимфоузлы, селезенка, почки, скелетные мышцы, плацента, кровь) и кровь больных животных (2, 21).

Для выделения вируса Акабана обычно используют 1-2-суточных сосунков белых мышей, которые представляют собой наиболее чувствительную систему для изоляции всех буньявирусов (21).

Разработанная нами тест-система для обнаружения генома вируса болезни Акабана на основе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени позволяет выявлять геном вируса болезни Акабана в пробах мозга экспериментально зараженных мышей и в инфицированных культурах клеток (22, 23).

Нашей целью было изучение возможности выявления РНК вируса болезни Акабана в крови экспериментально зараженных морских свинок с использованием предложенной тест-системы и получение проб органов от инфицированных особей для дальнейших исследований.

Методика. Для получения культурального вирусосодержащего материала проводили заражение культуры клеток CV-1 вирусом болезни Акабана (штамм В8935). Инфицированную культуру инкубировали в стационарных условиях при $37 \pm 0,5$ °С в течение 2-3 сут. Титрование вируса проводили в лунках полистироловых пластин с монослойной культурой клеток CV-1. Наблюдение вели в течение 7 сут. Результаты титрования учитывали по цитопатогенному действию (ЦПД).

Здоровых морских свинок (масса каждой по 400 г) заражали концентрированным культуральным материалом, содержащим вирус болезни Акабана (штамм В8935) с инфекционной активностью $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Эксперимент по заражению морских свинок проводили в трех повторностях. Всех морских свинок разделили на две группы. Морским свинкам из I группы вводили культуральный вирусосодержащий материал в объеме 50 мкл, при инфицировании особей из II группы дозу увеличивали 10-кратно (500 мкл).

Начиная со 2-х по 6-е сут после заражения, у всех животных ежедневно отбирали пробы крови и исследовали с использованием «Тест-системы для выявления РНК вируса болезни Акабана методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (3, 22, 23). Дополнительно с целью получения биоматериала для дальнейшей научно-исследовательской работы на 4-е сут после заражения у морских свинок из II группы были взяты пробы органов (мозга, легкого, почек, лимфоузла, сердца).

Вирусную РНК из биологического материала выделяли методом

нуклеосорбции с использованием набора TRIzol LS Reagent («Invitrogen, Inc.», США) согласно рекомендациям производителя (23, 24).

Постановку ОТ-ПЦР осуществляли в амплификаторе Rotor Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) в соответствии с инструкцией к тест-системе (3, 22, 23).

Результаты. Вирус болезни Акабана размножается на куриных эмбрионах и на мышьях-сосунах (при внутримозговом заражении у них через 2-3 сут развиваются параличи). К возбудителю чувствительны также переливаемые клеточные линии различного происхождения — ВНК-21, VERO, HmLu-1 с выраженным ЦПД через 48-72 ч.

Поскольку одной из задач работы было получение проб биоматериала от лабораторных животных для дальнейшего использования в научных исследованиях, в качестве экспериментальных объектов были выбраны именно морские свинки. По живой массе и массе внутренних органов они значительно превосходят лабораторных крыс и мышей, следовательно, для получения определенного количества биоматериала необходимо минимальное число животных.

Предложенная и примененная в настоящем исследовании тест-система основана на детекции продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров AV d и AV u, фланкирующих фрагмент размером 113 п.н., который комплементарен последовательности гена нуклеокапсидного белка N и зонда AV z, комплементарного внутреннему фрагменту выбранного участка (технология TaqMan). Эта тест-система обладает высокой чувствительностью: при исследовании тканей и органов соответствующий показатель составил $1,5 \pm 0,5 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, при анализе культурального материала — $1,0 \pm 0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

В пробах крови от всех морских свинок геном вируса болезни Акабана обнаруживался только на 4-е сут после заражения. Полученные результаты представлены в таблице. Гибель одной особи из II группы, зарегистрированная уже на 1-е сут после заражения, возможно, была обусловлена неспецифической реакцией, так как нам не удалось выявить геном вируса болезни Акабана при исследовании образцов органов, взятых *post mortem* у этого животного.

Результаты выявления генома вируса болезни Акабана в крови экспериментально зараженных морских свинок с использованием разработанной тест-системы на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Срок после заражения, сут	Группа экспериментальных животных	
	I (n = 12)	II (n = 8)
2-е	-	-
3-и	-	-
4-е	+	+
5-е	-	-
6-е	-	-

Примечание. «+» и «-» — соответственно выявление генома вируса в образцах и отрицательный результат тестирования.

В качестве примера на рисунке 1 представлены результаты амплификации образцов нуклеиновых кислот, выделенных из крови морских свинок в одном из проведенных экспериментов.

При исследовании тканей мозга, легких, почек, лимфоузла, сердца, взятых у животных из II группы, РНК вируса болезни Акабана обнаружили во всех исследуемых образцах. В качестве примера на рисунке 2 представлены типичные результаты амплификации нуклеиновых кислот, выделенных из внутренних органов морских свинок.

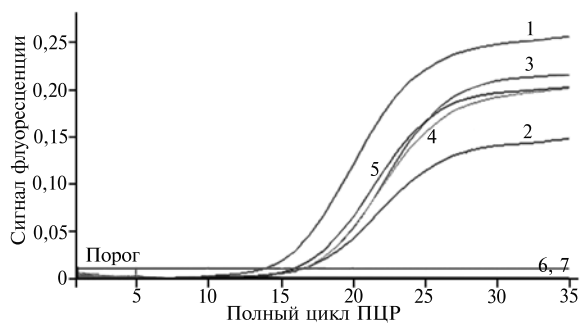


Рис. 1. Графики накопления флуоресцентного сигнала при выявлении генома вируса болезни Акабана в крови морских свинок с использованием разработанной тест-системы на основе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени: 1 — рекомбинантный положительный контроль амплификации; 2-5 — образцы от инфицированных животных (соответственно №№ 1-4); 6 — отрицательный контроль выделения; 7 — отрицательный контроль ПЦР (4-е сут

после экспериментального заражения; приведены результаты типичного опыта).

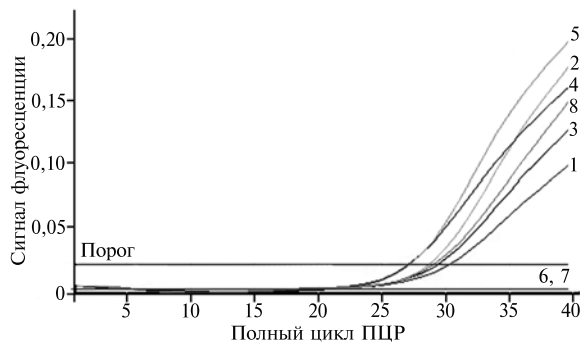


Рис. 2. Графики накопления флуоресцентного сигнала при выявлении генома вируса болезни Акабана в тканях внутренних органов у морской свинки № 4 с использованием разработанной тест-системы на основе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени: 1 — мозг; 2 — легкие; 3 — почка; 4 — лимфоузел; 5 — сердце; 6 — отрицательный контроль выделения; 7 — отрицательный контроль ПЦР; 8 — положительный контроль (4-е сут после экспериментального заражения).

Таким образом, с использованием тест-системы на основе ОТ-ПЦР в реальном времени, разработанной во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, РНК вируса болезни Акабана была выявлена в образцах органов и крови экспериментально зараженных морских свинок. Следовательно, животные этого вида могут быть использованы при валидации и апробации подобных тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акулов А.В., Апатенко В.М., Архипов Н.И. и др. Патологоанатомическая диагностика болезней крупного рогатого скота М., 1987.
2. Балашова Е.А. Идентификация вируса болезни Акабана с помощью серологических методов исследований. Ветеринария, 2012, 10: 56-57.
3. Хан Е.О. Идентификация вируса болезни Акабана на основе методов анализа генома. Канд. дис. Покров, 2013.
4. Metselaar D., Robin Y. Akabane virus isolated in Kenya. Vet. Record., 1976, 99(5): 86 (PMID 982784) (doi: 10.1136/vr.99.5.86-a).
5. Murray M.D. Akabane epizootics in New South Wales: evidence for the long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. Aust. Vet. J., 1987, 64(10): 305-308 (doi: 10.1111/j.1751-0813.1987.tb07332.x).
6. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М., 1998.
7. Matumoto M., Inaba Y. Akabane disease and Akabane virus. Kitasato Arch. Exp. Med., 1980, 53(1-2): 1-21 (PMID 6792415).
8. Doherty R.L., Carley J.G., Standfast H.A., Dyce A.L., Snowdon W.A. Virus strains isolated from arthropods during an epizootic of bovine ephemeral fever in Queensland. Aust. Vet. J., 1972, 48(3): 81-86 (doi: 10.1111/j.1751-0813.1972.tb02220.x).
9. Omori T., Inaba Y., Kurogi H. et al. Viral abortion, arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle in Japan, 1972-1974. Bulletin de l'Office International des Epizooties, 1974, 81: 447-458.
10. St George T.D., Cybinski D.H., Paull N.I. The isolation of Akabane virus from a normal bull. Aust. Vet. J., 1977, 53(5): 249 (PMID 901328).
11. Oem J.K., Lee K.H., Kim H.R., Bae Y.C., Chung J.Y., Lee O.S., Roh I.S. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus infection in Korea. J. Comp.

- Pathol., 2012, 147(2-3): 101-105 (doi: 10.1016/j.jcpa.2012.01.013). Epub 2012 Apr 19.
12. Jun Q., Qingling M., Zaichao Z., Kuojun C., Jingsheng Z., Minxing M., Chuangfu C. A serological survey of Akabane virus infection in cattle and sheep in north-west China. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2012, 44(8): 1817-1820 (doi: 10.1007/s11250-012-0168-3). Epub 2012 May 12.
 13. Elhassan A.M., Mansour M.E., Shamon A.A., El Hussein A.M. A serological survey of Akabane virus infection in cattle in Sudan. *ISRN Vet Sci.*, 2014 (Jan 21): 123904 (doi: 10.1155/2014/123904).
 14. Oem J.K., Yoon H.J., Kim H.R., Roh I.S., Lee K.H., Lee O.S., Bae Y.C. Genetic and pathogenic characterization of Akabane viruses isolated from cattle with encephalomyelitis in Korea. *Vet. Microbiol.*, 2012, 158(3-4): 259-266 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.017). Epub 2012 Mar 1.
 15. Oem J.K., Kim Y.H., Kim S.H., Lee M.H., Lee K.K. Serological characteristics of affected cattle during an outbreak of bovine enzootic encephalomyelitis caused by Akabane virus. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2014, 46(1): 261-263 (doi: 10.1007/s11250-013-0468-2). Epub 2013 Nov 16.
 16. Tsutsui T., Yamamoto T., Hayama Y., Akiba Y., Nishiguchi A., Kobayashi S., Yamakawa M. Duration of maternally derived antibodies against Akabane virus in calves: survival analysis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2009, 71(7): 913-918 (doi: 10.1292/jvms.71.913).
 17. Kim Y.H., Kweon C.H., Tark D.S., Lim S.I., Yang D.K., Hyun B.H., Song J.Y., Hur W., Park S.C. Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals*, 2011, 39(3): 152-157 (doi: 10.1016/j.biologicals.2011.02.004). Epub 2011 Mar 21.
 18. Hechinger S., Wernike K., Beer M. Evaluating the protective efficacy of a trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus against Schmallenberg virus infection. *Vet. Res.*, 2013, 44: 114 (doi: 10.1186/1297-9716-44-114).
 19. Qiao J., Wang J., Meng Q., Wang G., Liu Y., He Z., Yang H., Zhang Z., Cai X., Chen C. Rapid detection of Akabane virus by a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP). *Virol. J.*, 2013, 10: 288 (doi: 10.1186/1743-422X-10-288).
 20. Kittelberger R., McFadden A.M., Kirkland P.D., Hannah M.J., Orr D., Bueno R., Swainsbury R., Keen D., Jenner J., French J., Pigott C.J. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of serum antibodies against Akabane virus in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2013, 25(5): 645-648 (doi: 10.1177/1040638713500496). Epub 2013 Aug 13.
 21. Балашова Е.А. Разработка средств и методов лабораторной диагностики болезни Акабанае. Канд. дис. Покров, 1993.
 22. Жабон Е.О., Сальников Н.И., Балашова Е.А., Селянинов Ю.О. Выявление генома вируса болезни Акабанае методом Real-Time ПЦР. *Мат. Межд. конф. «Молекулярная диагностика-2010»*. М., 2010, т. 2: 97-99.
 23. Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Селянинов Ю.О., Балашова Е.А., Жабон Е.О., Сальников Н.И. Методические положения по выявлению РНК вируса болезни Акабанае методом полимеразной цепной реакции. Покров, 2011.
 24. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. М., 1986.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной
 вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии,
 601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
 e-mail: vniivvm@niiv.petush.elcom.ru, lenok.nikitina2010@yandex.ru,

Поступила в редакцию
 31 марта 2014 года

DETECTION OF AKABANE VIRUS GENOME IN ORGANS AND BLOOD OF EXPERIMENTALLY INFECTED CAVIES

E.G. Nikitina, N.I. Salnikov, S.A. Katorkin, E.A. Balashova, S.Zh. Tsybanov, D.V. Kolbasov, A.V. Lunitsin

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail vniivvm@niiv.petush.elcom.ru, lenok.nikitina2010@yandex.ru

Received March 31, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.6.67eng

Abstract

Akabane disease, a transmissible pathology of cattle, sheep and goats, is caused by *Simbu* serotype virus (*Bunyaviridae*) and results in significant economical losses due to abortions, unviable and abnormal calves, or dead embryos and calves born. The Akabane disease epizooties, char-

acterized by geographic locations and the coincidence with definite seasons, are widely registered. For preparative accumulation of Akabane virus the 1-2 day mice are used as the most sensitive system for *Bunyaviridae* isolation. Earlier we reported the development of a test system for Akabane virus RNA indication by real time reverse transcription PCR. Its efficacy was approved using infected mice and cell cultures. Furthermore, it was of interest to estimate this test system with respect to more wide range of model animals to be involved in the study and reproduction of Akabane virus. In this investigation, healthy cavies ($n = 20$, the animal weight of 400 g) were infected with a concentrated viral culture (B8935 strain) of $7.0 \lg \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. In blood the Akabane virus RNA was detected in four animals only 4 days after inoculation, but not shown in the rest probes, which were sampled from 2 to 6 days, and one cavy died a day after infection, probably due to nonspecific reaction as the Akabane virus genome was not detected in the post mortem tissue samples of all the organs of the animal tested. After 4 days the Akabane virus RNA was also indicated in brain, lung, kidney, hart and lymphatic gland. Thus, the developed test-system is effective for Akabane disease diagnosis, and the experimentally infected cavies can be the model animals used to study and produce Akabane virus preparations.

Keywords: Akabane disease, Akabane virus, cavies, *Culicoides*, reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR, test-system.

Вниманию читателей!

Подписку на журнал «Сельскохозяйственная биология» на 2015 год можно оформить через почтовое отделение

Информация о нашем издании помещена в Объединенном каталоге «Российские и зарубежные газеты и журналы»

Индекс — 70804

С 1989 года номера журнала разделены по тематике:

№№ 1, 3 и 5 посвящены проблемам биологии растений,

№№ 2, 4 и 6 посвящены проблемам биологии животных.

Профиль журнала остается прежним.

На журнал можно также подписаться через редакцию. Для этого необходимо перевести деньги на расчетный счет редакции

- ✍ Институты и организации заключают договора подписки и перечисляют деньги на счет редакции.
- ✍ Индивидуальные подписчики почтовым переводом перечисляют деньги на счет редакции. Квитанцию с указанием точного адреса (индекс обязателен), на который нужно выслать журнал, необходимо переслать в редакцию.
- ✍ Стоимость подписки 594 руб. за один номер (НДС не облагается).

Срок подписки не ограничен

Банковские реквизиты редакции:

Получатель — ИНН 7708051012

Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология»,

Марьиноорощинское ОСБ 7981, г. Москва, р/с 40703810638050100603

Банк получателя — Сбербанк России ОАО, г. Москва, БИК 044525225,

к/с 3010181040000000225

Адрес редакции: 127434 г. Москва, Дмитровское ш., д. 11, офис 343

Адрес в Интернете: www.agrobiology.ru

E-mail: agrobiol@mail.ru

Новые книги

Абдурахманов Г.М., Мяло Е.Г., Огуреева Г.Н. **Биогеография**. М.: изд-во «Академия», 2014, 448 с.

В учебнике рассмотрены основные разделы современной биогеографии. Особое внимание уделено экологической биогеографии, показано соотношение экологических и исторических факторов и дифференциации биоты. Охарактеризованы биомы суши и океанов, рассмотрены проблемы сохранения биологического разнообразия.

Козлов С.А., Парфенов В.А. **Конево-**

ство. М.: изд-во «КолосС», 2012, 352 с.

Учебник подготовлен в соответствии с примерной программой дисциплины «Коневодство», рекомендованной Министерством образования Российской Федерации, и предназначен для студентов зооинженерных и аграрных факультетов сельскохозяйственных вузов и университетов. В учебнике приводятся современные материалы по всем разделам программы, позволяющие в полном объеме освоить дисциплину «Коневодство» для эффективного использования этих знаний в практической работе.