

На правах рукописи

**АНОЯТБЕКОВА**

Афшона Музафарбековна

**ПОГРАНИЧНАЯ БОЛЕЗНЬ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА В  
РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Москва – 2018

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

**Научный руководитель:**

доктор ветеринарных наук, профессор **Юров Константин Павлович**

**Официальные оппоненты:**

**Петрова Ольга Григорьевна** – доктор ветеринарных наук, профессор, кафедры инфекционной и незаразной патологии животных ФГБОУ ВО Уральский ГАУ, факультет ветеринарной медицины и экспертизы.

**Будулов Нурдин Рагимханович** – доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией вирусологии, Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный центр агробиотехнологии Российской академии наук (СФНЦА РАН)

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

**Ездакова Ирина Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Пограничная болезнь – вирусное заболевание мелкого рогатого скота, характеризующееся расстройством функции репродуктивной системы, абортами, рождением нежизнеспособного или слабого персистентно-инфицированного (ПИ) плода, пороками развития плода, тремором, проблемами шерстного покрова у родившихся животных (Луговцев В.Ю. соавт., 1998; Луговцев В.Ю., 2000; Юров К.П. соавт., 2015; Kaleibar, M.T. et al., 2014; Loken T., 1995; Mishra N. et al., 2016; Nettleton P.F. et al., 1998). Заболевание наносит серьезный экономический ущерб овцеводству, вызывая прямые потери мясного и молочного производства, торговли и переработки продукции животного происхождения (Луговцев В.Ю., 2000; Mishra N. et al., 2016; Oguzogly T.C., 2012). Возбудитель пограничной болезни относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae и обозначается как Pestivirus D (King A.M.Q. et al., 2018; Smith D.V. et al., 2017). Вирус имеет близкое антигенное и генетическое родство с вирусами классической чумы свиней и вирусной диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота (ВД-БС КРС), (Луговцев В.Ю., 2000; Becher P. et al., 2003; Nettleton P.F. et al., 1998; Nettleton P.F., 1987; Nettleton P.F. et al., 1995; Vilcek S. et al., 1997;) и представлен восемью генотипами (Peletto S. et al., 2015).

Для овцеводческих и козоводческих хозяйств Республики Таджикистан серьезную угрозу представляют заболевания респираторных органов и репродуктивной системы различной этиологии (Амирбеков М. соавт., 2012; Амирбеков М., 1993; Курбонбекова З.Д. соавт., 2007; Курбонмамадова Г.К. соавт., 2011; Сатторов И.Т., 1995). По заключению экспертов МЭБ, вспышки этих болезней в регионе Центральной Азии обусловлены вирусом чумы мелких жвачных животных (Мурватуллоев С.А. соавт., 2011; Kwiatak O. et al., 2007).

В доступной литературе данные о циркуляции пестивирусов в Республике Таджикистан крайне ограничены и основываются на сообщении З.Д. Курбонбековой (2007) об обнаружении антител к возбудителю вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) у молодняка крупного и мелкого рогатого скота (Курбонбекова З.Д., 2007). В результате определённой схожести симптоматики,

патологоанатомических изменений и эпизоотологических характеристик пестивирусных инфекций, под одним диагнозом могут регистрироваться болезни разной этиологии. Следовательно, изучение этиологии массовых заболеваний овец и коз, идентификация и типирование возбудителя пограничной болезни, является актуальным направлением научных исследований и экономически важной народно-хозяйственной задачей.

**Степень разработанности темы исследования.** Впервые пограничная болезнь была обнаружена в 1959 году на границе Англии и Уэльса и описана L.E. Hughes и соавторами (1959). С тех пор заболевание получило широкое распространение в США, Канаде, Новой Зеландии, Китае, Индии, Японии, Австралии, Турции, Тунисе, Иране, странах ЕС и др. странах (Ciulli S. et al., 2016; Dubois E. et al, 2008; Kawanishi, N. et al., 2014; Leskova V. et al., 2013; Li, W. et al., 2013; Mishra N. et al., 2016; Nettleton P.F. et al., 1998; Oguzoglu T.C. et al., 2009; Rosamilia A. et al., 2014; Sullivan D.G. et al., 1997). Большой вклад в изучении болезни внесли такие ученые как R.M Barlow (1969), B.W Manktelow (1969), R.A. Huck (1975), T. Loken (1995), P.F. Nettleton (1998) и др., работы которых содержат фундаментальные основы описания болезни. Изучению молекулярно-генетических характеристик вируса посвящены труды P. Becher и соавторов (1996, 2003, 1999, 1994, 2011) M. Giangaspero (1999) и др. Многими исследователями предложены различные методы диагностики пограничной болезни (Dubey P. et al., 2014; Huck R.A. et al., 1975; Kalaiyarasu S. et al., 2015). S. Vilcek и D. Paton (2000) разработали метод на основе ПЦР. Праймеры, предложенные авторами, также рекомендуются МЭБ для диагностики пограничной болезни у овец и коз (Vilcek S. et al., 2000; OIE, 2012). В России изучению и характеристике вируса пограничной болезни посвящены исследования В.Ю. Луговцева (2000). Автор использовал в работе известные референтные штаммы вируса (Луговцев В.Ю., 2000).

Известно, что пестивирусы являются частыми контаминантами биологических продуктов, представляющих опасность как источник инфекции (Алексеев С.В. соавт., 2013; Урываев Л.В. соавт., 2012; Audet S.A. et al., 2000;

Bolin S.R. et al., 1991; Giangaspero M. et al., 2001; Giangaspero M., 2013; Loken T. et al., 1991). Исследованиями F. Thabti с соавторами (2005) и T. Loken с соавторами (1991) были описаны случаи контаминации партий вакцин вирусом пограничной болезни.

Несмотря на наличие множественных сообщений об идентификации вируса пограничной болезни в различных странах, данные о циркуляции вируса в Республике Таджикистан отсутствуют. В связи с этим, учитывая торгово-экономические связи между странами, высока вероятность распространения болезни в ранее благополучные регионы, в том числе в Республику Таджикистан.

**Цель и задачи исследования.** Целью нашей работы являлось выявление возбудителя пограничной болезни при массовых респираторных и репродуктивных заболеваниях мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан, его типирование и молекулярно-генетическая характеристика. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести комплексное исследование биологического материала от овец и коз на наличие возбудителя и получить экспериментальные данные, характеризующие участие вируса пограничной болезни в этиологии массовых заболеваний овец и коз;

2. Провести определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ обнаруженного вируса;

3. Установить на основании полученных данных типовую принадлежность изолятов и депонировать их в GenBank;

4. Получить чувствительную культуру клеток, свободную от вирусной контаминации и перспективную для культивирования вируса пограничной болезни, а также определить культуральные характеристики (цитопатогенность) эпизоотических изолятов.

**Научная новизна работы.** Получены с помощью иммунологических, вирусологических, молекулярно-генетических методов новые данные, подтверждающие роль пестивирусов (Pestivirus A и D) в этиологии массовых заболеваний мелких жвачных животных в регионе.

Впервые в регионе Центральной Азии – Республике Таджикистан обнаружен и типирован возбудитель пограничной болезни овец (Pestivirus D).

Посредством определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена полипротеина (N<sub>pro</sub>) и филогенетического анализа показано, что изолят, идентифицированный в Таджикистане, относится к вирусу пограничной болезни и представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри генотипа 3.

Установлено, что изоляты вируса, идентифицированные нами, относятся к нецитопатогенному биотипу.

Циркуляция пестивируса подтверждена серологическими методами (реакцией иммунофлуоресценции и реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле).

Впервые обнаружен геном Pestivirus H – Хоби-вируса – Атипичного пестивируса в составе коммерческой вирусвакцины против чумы мелких жвачных, использовавшейся для профилактической иммунизации овец и коз в Таджикистане.

Определены и депонированы нуклеотидные последовательности участков геномов обнаруженных нами вирусов в GenBank под номерами доступа KX900608.1. и KX900607.1.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Идентификация нового для Республики Таджикистан пестивируса (Pestivirus D) – возбудителя пограничной болезни овец представляет научное обоснование для разработки противоэпизоотических мероприятий против этого заболевания, а также предупреждения Хоби-вирусной инфекции. Полученные данные позволяют повысить целенаправленность и эффективность мероприятий по борьбе с чумой мелких жвачных животных, представляющей угрозу продовольственной безопасности миллионам сельских семей. Эти исследования комплементарны рекомендациям 84 Генеральной сессии МЭБ в мае 2016 г. в рамках «Глобальной стратегии контроля и искоренения чумы мелких жвачных животных» (OIE and FAO, 2016).

По результатам исследования разработаны методические положения «Диагностика пестивирусных инфекций овец методами молекулярно-генетического анализа», утвержденные РАН, депонирована культура клеток тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ) в специализированной коллекции СХЖ РККК ВИЭВ, депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности изолята вируса пограничной болезни овец, а также Хоби вируса под номерами доступа KX900608.1. и KX900607.1

**Методология и методы исследования.** В работе использованы молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР, определение нуклеотидной последовательности и филогенетический анализ), вирусологические (культивирование и выделение вируса), серологические (РДП, РИФ), физико-химические (приготовление различных растворов) методы исследования.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты экспериментальных исследований этиологической структуры массовых заболеваний мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан, полученные путём комплексных иммунологических (серологических), вирусологических и молекулярно-генетических исследований.

2. Данные филогенетического анализа, полученные путем сравнительного исследования штаммов из Международной базы данных (INSDC) и эпизоотически актуального пестивируса, который относится к вирусу пограничной болезни и представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри генотипа 3.

3. Данные серологических исследований, характеризующие распространенность пестивирусов в хозяйствах, неблагополучных по массовым респираторно-репродуктивным заболеваниям овец и коз, с положительным результатом от 4,5% до 73,2%.

4. Результаты молекулярно-генетического типирования Pestivirus H – Хоби-вируса, обнаруженного в составе коммерческой вирус вакцины против чумы мелких жвачных животных.

5. Методические положения по диагностике пестивирусных инфекций овец с применением методов молекулярно-генетического анализа.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Все этапы исследования выполнены на сертифицированном откалиброванном оборудовании, которое обеспечивает высокую достоверность результатов. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях Ученого совета и Методической комиссией ФГБНУ ВИЭВ (2014-2017 гг.), представлен (стендовый доклад) на ISV Annual Congress (Boston, Massachusetts October 2-4th, 2016).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано пять научных работ, в том числе четыре статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, рекомендованных для публикации научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

**Личный вклад соискателя.** Все этапы работы были выполнены при непосредственном участии автора диссертационной работы. Участие соавторов отражено в совместно изданных научных публикациях.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность профессору М. Амирбекову, Т. Тиллоеву, Ш. Шодмонову, Х.Э. Нураеву – сотрудникам Национального Диагностического центра ветеринарной диагностики Республики Таджикистан, а также сотрудникам лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН к.б.н. С.В. Алексеенковой, К.А. Диас Хименес, заведующей лабораторией клеточной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН к.б.н. Т.В. Гальнбек за оказанное содействие и помощь в выполнении нашей работы.

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность научному руководителю заведующему лабораторией вирусологии, доктору ветеринарных наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ, лауреату премии Совета Министров СССР, лауреату Государственной премии Республики Саха (Якутия) К.П. Юрову за научно-методическое руководство при выполнении экспериментальной работы и анализе полученных результатов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 121 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и



обсуждение собственных исследований, выводы, практические предложения, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список использованной литературы и приложения. Список литературы содержит 195 источников, из них 153 иностранных. Диссертация иллюстрирована 5 таблицами, 18 рисунками (в т.ч. 12 фотографиями, 2 диаграммами, 2 дендрограммами).

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа проведена в 2014-2017 гг. в лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ по заданию НИР №0578-2014-0023 «Сформировать базу данных вирусов – возбудителей респираторных и лихорадочных болезней лошадей и крупного рогатого скота, в т.ч. нетипичных и малоизученных, находящихся в активной циркуляции, в т.ч. природных биоценозах для совершенствования методов диагностики» программы фундаментальных научных исследований государственных академических наук на 2013-2020 годы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Материал для исследования** был получен с помощью сотрудников Национального центра ветеринарной диагностики города Душанбе, Республики Таджикистан. Объектом исследования являлись овцеводческие и козоводческие хозяйства различного профиля 13-и районов, в которых регистрировали респираторные, желудочно-кишечные и репродуктивные заболевания мелкого рогатого скота. Исследовали клинический и патологический материал от больных, вынуждено убитых животных и абортированных плодов. Предварительная обработка материала проводилась на базе лаборатории Национального центра ветеринарной диагностики.

**Вирусы.** В работе использовали: референтный штамм Oregon C24V (субтип 1a) вируса ВД-БС КРС, а также изолят вируса ВД-БС субтипа 1a из персистентно инфицированной культуры клеток MDBK, вакцинный штамм вируса чумы мелких жвачных, штамм ТК-А вируса ИРТ в виде коммерческих лиофилизированных вакцин.

**Культуры клеток:** Использовали перевиваемую культуру клеток почки свиньи «РК-15», почку африканской зелёной мартышки «Vero», культуру клеток почки быка «MDBK» из коллекции клеточных культур ВИЭВ, а также полученные нами первичные и субкультивируемые культуры клеток тестикулов козленка (ТК) и почки ягненка (ПЯ). Культуры клеток выращивали на среде ИГЛА МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамина (ООО БиолоТ), добавлением 10% сыворотки крови КРС (Biosera, Франция) и антибиотика: амикацина по 1мг/мл (ОАО Синтез, Россия). Первично-трипсинизированную культуру клеток ПЯ и ТК готовили совместно с к.б.н. Гальнбек Т.В. по общепринятой методике. Монослой первичных культур клеток формировался на 3-4-е сутки.

**Культивирование вирусов.** Культивирование вируса ПБ проводили в соответствии с рекомендациями МЭБ (ОИЕ, 2012). Для этого использовали кусочки органов абортированных плодов (легкие, сердца, селезенка, печень, желудок). Супернатант измельченного патологического материала фильтровали с помощью шприцевой фильтрующей насадки через 0,45  $\mu\text{M}$  фильтр. 10%-ю вирусосодержащую суспензию наносили на монослой культуры клеток и инкубировали в течение 1-1,5 часов при 37°C в термостате при атмосфере CO<sub>2</sub>. После контакта, монослой клеток дважды промывали средой ИГЛА МЕМ с антибиотиком (амикацин по 1 мг/мл) и добавляли поддерживающую среду. Состав поддерживающей среды зависел от вида культуры клеток, используемой для заражения. Зараженные культуры клеток инкубировали в течение 4-6-и дней. После инкубации инфицированные культуры клеток замораживали при температуре минус 70°C и после оттаивания использовали для следующего пассажа.

**Реакция иммунофлуоресценции.** Для выявления пестивирусов НЦП биотипа использовали прямой метод постановки реакции. Монослой инфицированных клеток на покровных стеклах (слайдах) промывали фосфатно-солевым буферным раствором и фиксировали в смеси спирт-эфира в равном объеме. Затем наносили специфические иммуноглобулины мышей против ВД-БС

КРС, конъюгированные с ФИТЦ, в рабочем разведении и инкубировали в течение 30 минут в термостате. Иммуноглобулины мышей к ВД-БС КРС, конъюгированные с ФИТЦ, были ранее получены сотрудниками лаборатории вирусологии в.н.с., к.б.н. С.В. Алексеенковой и в.н.с., к.б.н. Г.К. Юровым (2013). Препараты просматривали в люминесцентном микроскопе. Размножение вируса в клетках культуры оценивали по наличию специфической желто-зелёной флуоресценции.

**Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле.** Апробированы несколько модификаций реакции, касающиеся состава буферной смеси, pH буфера, схемы размещения лунок в агаре, их диаметра. Остановились на варианте предложенном Л. Коггинсом (ОИЕ, 2013). Готовили агаровую среду, состоящую из 1% агара «Дифко» на фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,2). Учет результатов проводили через 24-72 часа постановки реакции. В качестве антигена пестивируса использовали осветленный лизат культуры клеток, зараженной штаммом «ОрегонС24V» или же персистентно-инфицированные клетки MDBK ВД-БС КРС, а также инфицированные культуры клеток вирусом пограничной болезни. Контролем служили вакцинный штамм ТК-А альфагерпесвируса КРС и вакцинный штамм чумы мелких жвачных животных.

**Молекулярно-генетические методы исследования.** Вирусную РНК из образцов цельной крови, тканей выделяли с помощью набора реагентов «РНК-Экстран» фирмы ЗАО «Синтол» по методике производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реагентов «ОТ-1» фирмы ЗАО «Синтол» по методике производителя. Использовали праймеры к фрагменту гена, кодирующего протеин NS3 ВД-БС КРС, к нетранслируемому участку мРНК – 5'UTR ВД-БС КРС, к генам, кодирующим полипептиды N и F вируса чумы МРС в соответствии с рекомендациями МЭБ (ОИЕ, 2013). Для идентификации вируса пограничной болезни овец использовали праймеры, комплементарные гену полипротеина (Npro). Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией для идентификации вируса ПБ выполняли в соответствии с рекомендациями МЭБ по методу, предложенному S.Vilcek и D. Paton (2000). Определение нуклеотидных последовательностей выполнено в

компании ЗАО «Синтол» на генетическом анализаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 («Applied Biosystems», США). Локальное выравнивание исследуемых нуклеотидных последовательностей с известными последовательностями проводили с помощью компьютерной программы «BLAST» (GenBank, INSDC). Множественное выравнивание и построение деревьев выполнены с использованием нуклеотидных последовательностей из Международной базы данных «International Nucleotide Sequence Data Collaboration» (INSDC) с помощью программ «ClustalW2» (Дублинский Университет, Ирландия), «MEGA 7.0» (Университет штата Аризона, США) методом «присоединения соседей» со значениями «Bootstrap» на основе 1000 повторов. Филогенетический анализ выполнен совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории вирусологии ВИЭВ, к.б.н. С.В. Алексеенковой.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Выявление антител к пестивирусам в пробах сыворотки крови овец и коз с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле**

На начальном этапе нашей работы с целью оценки распространенности пестивирусной инфекции в овцеводческих и козоводческих хозяйствах нескольких районов РТ использовали реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле. По данным P.D Kirkland и S.G MacKintosh (2006), с помощью РДП можно провести групповое исследование животных и обнаружить антитела ко всем штаммам пестивирусов у КРС, МРС и свиней. В представленных данных в руководстве по Диагностике и вакцинации МЭБ (ОИЕ, 2012), РДП рекомендуется для диагностики пограничной болезни МЖЖ. В качестве антигена для постановки РДП с целью обнаружения антител к вирусу ПБ может быть использован штамм OregonC24V ВД-БС (ОИЕ, 2012).

В нашей работе для проведения РДП в качестве антигена использовали культуральный антиген – осветлённый лизат культуры клеток почки теленка, зараженной вирусом ВД-БС – штамм ОрегонС24V или перевиваемой культуры клеток MDBK, персистентно инфицированной вирусом ВД-БС КРС. Персистентная инфекция культуры клеток MDBK ВД была ранее подтверждена

сотрудниками лаборатории вирусологии ВИЭВ, которые определили, что обнаруженный вирус ВД-БС в составе данной культуры клеток относится к генотипу 1 субгенотипу 1а ВД-БС КРС (Алексеев С.В. и соавт., 2013). Исследовали пробы сыворотки крови, которые получали из хозяйств (отар), неблагополучных по респираторным и репродуктивным заболеваниям МРС. Использовали стандартную схему РДП (Л. Коггинс). В результате исследования обнаружили положительно реагирующие сыворотки, которые использовали в тест-системе при последующем серологическом мониторинге пестивирусных инфекций мелких жвачных животных в нескольких регионах. В качестве положительной контрольной сыворотки также использовали гипериммунную сыворотку к вирусу ВД-БС штамму «OregonC24V», любезно предоставленную нам сотрудниками лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

В результате проведенного исследования, было определено, что среднее количество положительных проб, к общему числу исследованных составляет 27%. Из числа исследованных проб из различных районов РТ наибольшее число – 73,2% положительных результатов получено в районе Вахш. В районе Рудаки число положительных проб составляет 70%, в районе Явана 50%, в районе Сарбанд 30,8%, в районе Гиссар 30,5%, в районе Нурабад 25%, в районе Турсунзаде 24%, в районе Файзабад 7,7%, в районе Пенджикент 9,09%, в районе Варзоб 4,5%. В пробах сыворотки крови МРС из Муминабада и Шаартуза антитела к вирусу ВД не обнаружены.

#### **Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле с контрольными антигенами**

Сыворотки овец и коз из 13-и регионов РТ исследовали в РДП с контрольными антигенами. В качестве контрольных антигенов использовали вакцинные вирусы ИРТ КРС штамм ТК-А и вирусвакцину против ЧМЖЖ. Результаты исследования показали, что со штаммом ТК-А вируса ИРТ КРС во всех случаях получали отрицательный результат. При использовании в качестве антигена вакцинного штамма ЧМЖЖ с некоторыми сыворотками получен положительный результат. В четырех районах РТ: Вахш (39,2%), в районе Гиссар

(19,4%), Сарбанд (15,3%) и в районе Варзоб (4,5%) сыворотки крови имеют антитела (поствакцинальных или постинфекционных) к вирусу ЧМЖ. В ряде случаев при исследовании проб сывороток крови овец и коз с вирусвакциной против ЧМЖЖ образовались двойные линии преципитации. Указанное свидетельствует о присутствии в исследуемом материале (вирусвакцина ЧМЖЖ) двух вирусов. Полученные на данном этапе данные мы расценивали как предварительные. Задачей последующих исследований являлось выделение вируса в культуре клеток и идентификация изолятов.

### **Выделение вируса в культурах клеток**

Для выделения вируса использовали перевиваемые культуры клеток: РК-15, Vero, а так же первичные культуры ПЯ и ТК. Первичные и перевиваемые культуры клеток после проверки на отсутствие персистентной вирусной инфекции использовали в своих опытах. Культивирование вируса проводили в течение 4-6-и суток. При ежедневной микроскопии зараженных культур клеток не удалось выявить достоверных изменений монослоя во всех культурах (перевиваемых и первичных). Несмотря на это, в некоторых опытах количество последовательных пассажей довели до 3-5. Отрицательные результаты (отсутствие видимых ЦП изменений) можно объяснить отсутствием в исследуемом материале вируса, либо наличием нецитопатогенных штаммов. В связи с этим для выявления вируса использовали прямой вариант РИФ с моноспецифической гипериммунной сывороткой мышей к вирусу ВД-БС, конъюгированной с ФИТЦ, а также РДП с положительными сыворотками овец.

### **Идентификация вируса в культурах клеток методом иммунофлуоресценции**

Для идентификации вируса НЦП биотипа использовали инфицированную культуру клеток, выращенную на покровных стеклах (слайдах) после 2-го и 3-го пассажа исследуемого материала от больных и павших животных. Клетки, выращенные на слайдах, фиксировали через 72 часа после внесения исследуемого материала и просматривали под люминесцентным микроскопом. В случае

положительного результата РИФ, наблюдали характерное желто-зелёное свечение (Рисунок 1).

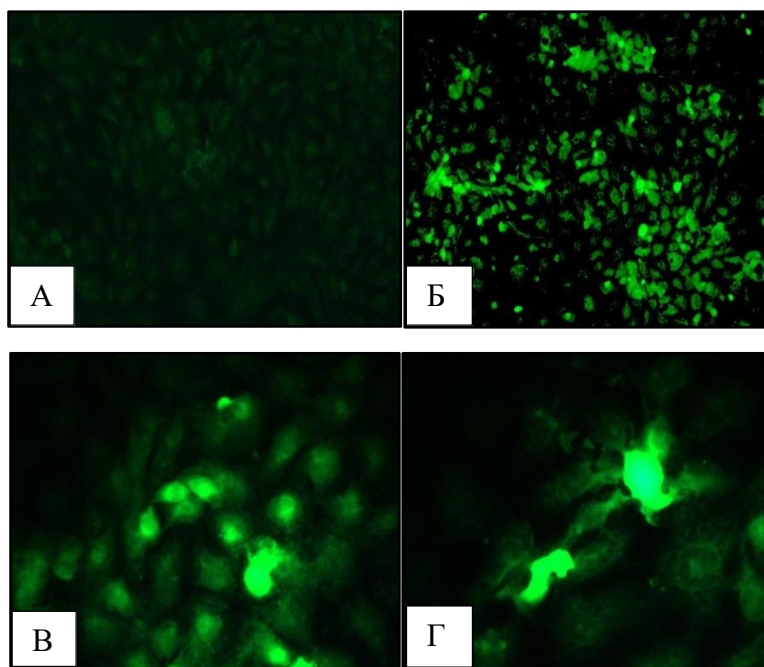


Рисунок 1 – Выявление пестивируса НЦП биотипа методом РИФ в культуре клеток РК-15 через 72 часа после инокуляции исследуемого материала – 10% суспензией легких абортрованного плода – 3 пассаж. А. Увеличение x200; В. Увеличение x400; Г. Увеличение x630

Результаты РИФ позволили сделать вывод, что в культуре клеток наблюдается репродукция пестивируса. Вирусная инфекция имеет характер персистентной инфекции. Об этом свидетельствует специфическая флуоресценция в цитоплазме и ядре клеток культуры. Наиболее демонстративные результаты были получены в культурах клеток РК-15 и ПЯ.

#### **Выявление вируса в культурах клеток с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле**

Для выявления пестивирусов в культурах клеток с помощью РДП использовали положительную преципитирующую сыворотку овцы. Результаты исследования показали, что эпизоотические НЦП изоляты существенно различаются по их способности размножаться *in vitro*, что отчасти, по-видимому, объясняется свойствами культуры клеток (чувствительностью). Из числа

исследованных проб только в четырёх случаях в культурах РК-15 и ПЯ был получен стабильный положительный результат в 5-ти пассажах вируса. В 4-х случаях получен отрицательный результат; в восьми – наблюдалась abortивная инфекция в 1-4 пассаже. Стабильные результаты получали при использовании в качестве источника вируса материала легких и печени abortированных плодов. В тех случаях, когда изменяли схему постановки РДП – в центральную лунку вносили положительную сыворотку овцы, в периферические лунки суспензию паренхиматозных органов, можно было наблюдать образование перекрещивающихся линий преципитации.

### **Идентификация и типирование вирусных изолятов**

Последующее изучение и типирование возбудителей было ограничено тем, что мы не располагали моноспецифическими сыворотками к пестивирусам различных типов. В связи с этим воспользовались молекулярно-генетическими методами исследования.

### **Выявление вируса пограничной болезни овец методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией**

Учитывая полученные положительные результаты в РИФ и РДП, клинический и патологический материал тестировали на наличие вируса ВД-БС и ЧМЖ с помощью молекулярных методов исследований. Результаты исследования показали, что в исследуемом материале отсутствуют данные возбудители. Использовали методику S. Vilcek и D.J. Paton (2000), которые предложили модификацию ОТ-ПЦР с вложенной парой праймеров («nested RT-PCR») для обнаружения и ускоренной идентификации возбудителей ПБ и ВД, позволяющую идентифицировать изоляты любого генотипа вируса ПБ и дифференцировать их от пестивирусов других видов. В результате в патологическом материале от овец из неблагополучных хозяйств нами был обнаружен пестивирус – возбудитель ПБО. При электрофоретическом анализе продуктов амплификации идентифицировали фрагмент ДНК длиной 225 п.н., в виде ярко выраженных полос ампликонов мишени. В тканях abortированных плодов овец вирус ПБ накапливается преимущественно в легких, в наименьшей степени в сердце,



печени и селезенке. Кроме того вирус можно выявить также в крови и слизистой желудка. Этот же возбудитель обнаружили в инфицированных нами культурах клеток. Следует отметить, что для обнаружения вируса ПБ в паренхиматозных органах в большинстве случаев достаточно одноэтапной ПЦР, что позволяет ускорить процесс проведения реакции.

### **Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ вируса пограничной болезни овец**

Для уточнения полученных результатов провели определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации. Результаты сравнительного исследования с помощью компьютерной программы «BLAST» нуклеотидных последовательностей исследуемого вируса и референтных штаммов базы данных INSDC показали сходство вируса, обнаруженного на территории Республики Таджикистан, с вирусом пограничной болезни. Установлено, что найденный вирус имеет сходство выравнивания нуклеотидных последовательностей с таковыми штамма вируса ПБ «297» из Словакии (гомология 91%), выделенного от овец, и штамма «АН12-01» вируса ПБ, выделенного от козы в Китае (гомология 90%). На 88% гомология составляет со штаммом «JSLS12-01» изолированного у овцы в Китае и штаммом «Gifhorn genotype 3» изолированного у свиней в Германии. Следовательно, идентифицированный нами вирус относится к ВПБ, формирует отдельный кластер и существенно отличается от группы штаммов, отнесенных к генотипу 3 ранее (Рисунок 2).

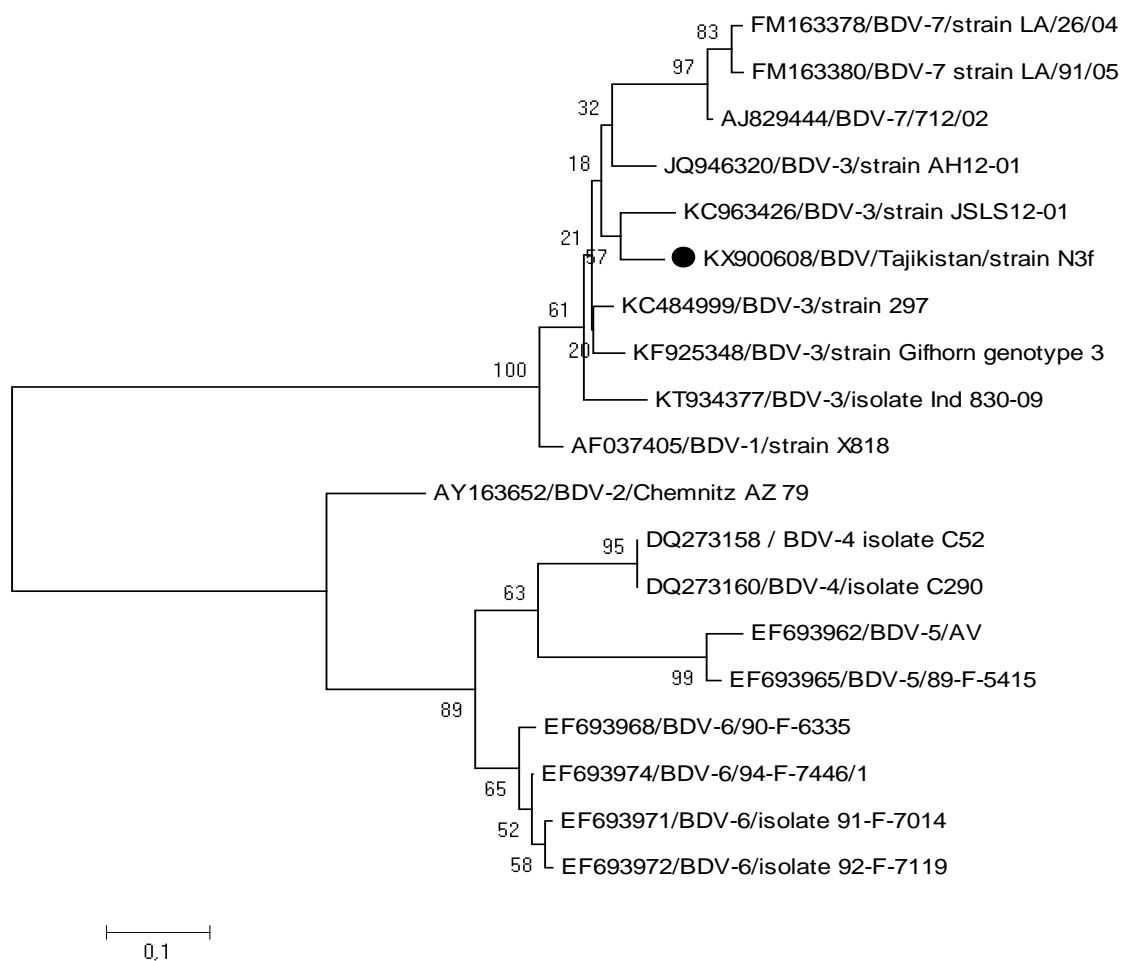


Рисунок 2 – Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства между Таджикским изолятом и референтными штаммами вируса пограничной болезни, основанного на анализе нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего полипротеин (Npro)

Филогенетическое дерево сконструировано с помощью восходящего кластерного метода ближайших соседей в программе MEGA 7.0., которое включает изолят ПБ, выделенный у овец в Таджикистане, и гомологичные последовательности, доступные в GenBank. Номера доступа каждой последовательности указаны в дереве. Отображающие номера рядом с ветвями объясняют процент репликации 1000 повторов, поддерживающие каждую филогенетическую ветку. Расстояния вычислялись с использованием метода максимального композитного правдоподобия. Длина каждой пары ветвей представляет собой расстояние между парами последовательностей. Для создания

филогенетического дерева использовали 18 нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена Npro выделенного нами вируса ПБО, депонирована в GenBank под номером доступа KX900608.1.

Следовательно, результаты проведенных исследований подтвердили наличие в патологическом и клиническом материале возбудителя ПБО. В связи с этим, мы повторили исследования в РДП. Полученный нами культуральный изолят вируса ПБО использовали в качестве антигена для постановки РДП с положительными сыворотками овец. Результаты исследования показали, что положительные сыворотки с антигеном на ВД-БС также положительны и на ПБО.

### **Идентификация возбудителя вирусной диареи 3-го генотипа**

#### **Хоби вируса**

Учитывая литературные данные последних лет о контаминации биологических продуктов пестивирусами (Алексеев С.В. соавт., 2013; Урываев, Л.В. соавт., 2012; Audet, S.A. et al., 2000; Giangaspero M. et al., 2001; Giangaspero M., 2013; Harasawa, R. et al., 1994; Harasawa, R. et al., 1995), результатов собственных исследований в РДП (образование двойных линий преципитации), мы сочли необходимым провести исследование одной из коммерческих вакцин против ЧМЖ, которая применялась для вакцинации овец в некоторых регионах Республике Таджикистан. Полученные методом ОТ-ПЦР данные подтвердили наличие в составе препарата вируса ЧМЖ. Сравнительный анализ с помощью компьютерной программы BLAST показал гомологию происхождения нуклеотидных последовательностей генов вирусов ЧМЖ, зарегистрированных в INSDC, и обнаруженного нами штамма. При последующем тестировании в составе той же серии вакцины были обнаружены и гены вируса ВД-БС с праймерами, фланкирующими фрагмент гена неструктурного полипептида NS3 вируса ВД-БС КРС. Было также установлено родство нуклеотидных последовательностей генов изолята ВД-БС с таковыми возбудителя ВД-БС генотипа 3, так называемого Хоби вируса, зарегистрированного в INSDC. Гомология составляет 96% со штаммом СН-КаНо/cont ВД-3-го генотипа, выделенного из контаминированной культуры клеток (Рисунок 3).

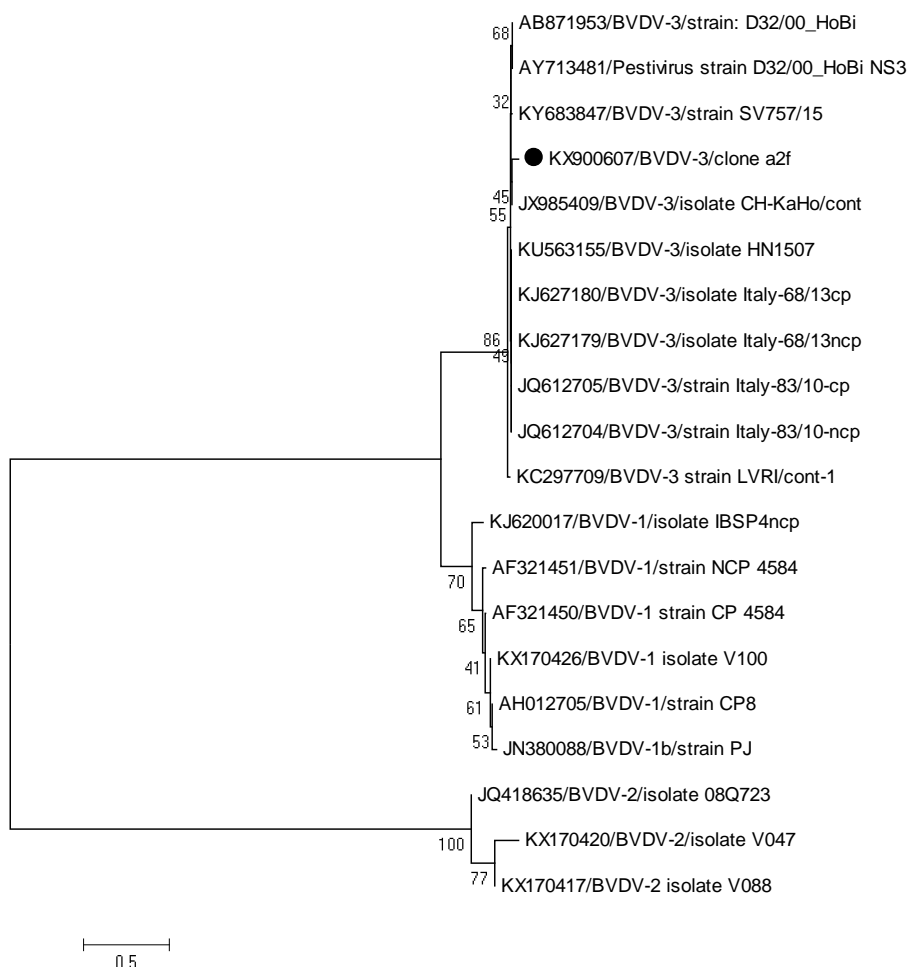


Рисунок 3 – Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства между новым изолятом и референтными штаммами вируса ВД-3-го генотипа (Хоби-вируса), основанного на анализе нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего белок NS3

Филогенетическое дерево сконструировано с помощью восходящего кластерного метода ближайших соседей в программе MEGA 7.0. При филогенетическом анализе использовались 20 гомологичных нуклеотидных последовательностей, доступных в GenBank и изолят ВД генотипа 3 в составе коммерческой вирусвакцины. Обнаруженные нами нуклеотидные последовательности фрагмента гена NS3 вируса ВД-3-го генотипа были депонированы в GenBank под номером доступа KX900607.1.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенных исследований, впервые установлено новое для Республики Таджикистан вирусное заболевание мелких жвачных животных – пограничная болезнь овец. Идентифицирован вирус пограничной болезни овец и депонирована в GenBank его нуклеотидная последовательность. Используя методы ПЦР и филогенетический анализ идентифицировали новый пестивирус – Хоби вирус, который является контаминантом коммерческой вакцины, используемой в Республике Таджикистан для профилактики ЧМЖЖ. Фрагмент нуклеотидной последовательности вируса зарегистрирован в GenBank. Вследствие определённого сходства клинического проявления, эпизоотологических данных ЧМЖЖ и пестивирусных инфекций, затрудняется дифференциальная диагностика этих заболеваний. Полученные нами новые данные изложены в работах, опубликованных в научных статьях, которые необходимо принимать во внимание при реализации мероприятий по борьбе с ЧМЖЖ в Республике Таджикистан.

## **РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ**

### **РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Полученные нами приоритетные результаты по обнаружению, идентификации возбудителя пограничной болезни в Центрально-Азиатском регионе – Республике Таджикистан, обуславливают перспективу исследований по ряду направлений, как научного так и практического плана, а именно:

- проведение комплексного мониторинга пестивирусных инфекций, прежде всего пограничной болезни, во всех регионах Республики Таджикистан с развитым животноводством;
- сравнительное изучение биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик новых изолятов, пестивирусов;
- выделение и селекция новых изолятов пестивирусов с целью совершенствования средств диагностики и профилактики инфекций;
- разработка рекомендаций и нормативных документов по диагностике заболевания и оздоровлению неблагополучных хозяйств, районов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании полученных результатов разработаны следующие практические предложения:

1. Методические положения «Диагностика пестивирусных инфекций овец методами молекулярно-генетического анализа», утвержденные РАН. Методические предложения предназначены для специалистов диагностических и научно-исследовательских учреждений преимущественно в зонах развитого овцеводства, преподавателей и студентов ветеринарных ВУЗов и техникумов.

2. Депонирована в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур (СХЖ РККК ВИЭВ) при ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, диплоидная культура клеток тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ). Предназначена для исследования вирусов МРС, КРС, пчел, выделение, накопление, изготовление диагностикумов, вакцин.

3. Депонированные генетические последовательности вируса пограничной болезни овец под номером доступа КХ900608.1. и вирусная диарея 3-го генотипа – Хоби-вируса под номером доступа КХ900607.1., которые могут быть использованы для проведения филогенетического анализа.

## ВЫВОДЫ

1. Проведёнными комплексными исследованиями: вирусологическими, серологическими и молекулярно-генетическими впервые в Центральной Азии – Республике Таджикистан идентифицирован возбудитель пограничной болезни овец.

2. Методом определения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа установлено, что вирус, идентифицированный в Таджикистане, относится к вирусу пограничной болезни, представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри третьего генотипа. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего полипротеин (N<sub>pro</sub>), имеет на 91% сходство со штаммом «297» пограничной болезни, выделенного от овец в

Словакии. В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего полипротеин (Npro) Таджикского изолята пограничной болезни овец под номером доступа KX900608.1.

3. Серологическими исследованиями в хозяйствах, неблагополучных по массовым респираторным, желудочно-кишечным и репродуктивным заболеваниям овец и коз, обнаружены антитела к пестивирусу. Количество серологически положительных животных составило от 4,5% до 73,2%.

4. Получены культуры клеток свободные от вирусной контаминации. Показано, что наиболее чувствительными к вирусу пограничной болезни овец являются первичная культура клеток почки ягненка (ПЯ) и перевиваемая культура клеток почки свиньи (РК-15).

5. Изучены культуральные свойства обнаруженных в Таджикистане изолятов вируса пограничной болезни овец. Установлено, что все изоляты вируса пограничной болезни овец, идентифицированные нами, относятся к нецитопатогенному биотипу. Отмечено, что при серийном пассировании возбудителя в культуре клеток, большая часть изолятов индуцирует abortивную инфекцию.

6. В составе коммерческой вирусвакцины против чумы мелких жвачных животных, применявшейся в Республике Таджикистан, идентифицирован геном нового пестивируса. Методами определения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа показано, что вирус относится к Pestivirus Н-вирусной диареи 3-го генотипа – Хоби-вируса – атипичного пестивируса и обладает 96% идентичностью с изолятом «isolate СН-КаНо/cont» вирусной диареи генотипа 3 изолированного из контаминированной культуры клеток. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего NS3 ВД-3 изолята, депонирована в GenBank, номер доступа KX900607.1.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Аноятбекова, А. М. Выявление нового пестивируса в Республике Таджикистан / **А.М. Аноятбекова**, С.В. Алексеенкова, К.П. Юров // Электронный научный журнал *Argiori*. Серия: естественные и технические науки. – 2016. – №3. – С.37.
2. Аноятбекова, А. М. Молекулярно- эволюционный генетический анализ вируса пограничной болезни, выявленного у овец в Таджикистане / **А.М. Аноятбекова**, С.В. Алексеенкова, К.П. Юров // *Ветеринария*. – 2017. – №1. – С. 23-26.
3. Аноятбекова, А. М. Пестивирусная инфекция мелкого рогатого скота / **А.М. Аноятбекова** // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. – 2018. – №2.– С.30-35.
4. Юров, К.П. Новый пестивирус – Хоби вирус – контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных / К.П. Юров, **А.М. Аноятбекова**, С.В. Алексеенкова // *Ветеринария*. – 2016. – №10. – С. 8-10.
5. Юров, К. П. Роль пестивирусов в инфекционной патологии овец и коз / К.П. Юров, **А.М. Аноятбекова**, К.А. Диас Хименес, С.В. Алексеенкова // *Ветеринария*. – 2015. – №9. – С. 3-8.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВД** – вирусная диарея  
**ВД-БС** – вирусная диарея – болезнь слизистых  
**КРС** – крупный рогатый скот  
**МРС** – мелкий рогатый скот  
**МЭБ** – Международное эпизоотическое бюро  
**МДВК** – перевиваемая культура клеток почки быка  
**НЦП** – нецитопатическое действие  
**ОТ-ПЦР** – Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией  
**ПБ** – Пограничная болезнь  
**ПБО** – Пограничная болезнь овец  
**ПЯ** – культура клеток почки ягненка  
**РДП** – реакция диффузионной преципитации  
**РИФ** – реакция иммунофлуоресценции  
**РК-15** – культура клеток почки свиньи  
**РНК** – рибонуклеиновая кислота  
**РТ** – Республика Таджикистан  
**ТК** – культура клеток тестикулов козленка  
**ЧМЖЖ** – Чума мелких жвачных животных  
**ЦП** – цитопатическое действие