

УДК 57:578-52

АНАЛИЗ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ (I73R/I329L;B602L;CD2V) ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016-2017 ГОДАХ.

Титов И.А., научный сотрудник лаборатории Молекулярной Вирусологии, Кудряшов Д.А., микробиолог лаборатории Диагностики и мониторинга, Шкаликова М.В., младший научный сотрудник лаборатории Молекулярной вирусологии, Сибгатуллова А.К., микробиолог лаборатории Диагностики и мониторинга

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии", пгт. Вольгинский, Владимирская область, Россия

Ключевые слова: Вирус Африканской чумы свиней, генотипирование, секвенирование, маркерные гены.

Проведён анализ нуклеотидных последовательностей ряда маркерных генов (I73L/I329R;B602L,CD2v) двадцати трёх изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации в 2016-2017 годах от кабанов и домашних свиней.

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозное заболевание, этиологическим агентом которого является ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Asfviridae*, роду *Asfivirus*. Вследствие биологии возбудителя, в настоящее время невозможна разработка эффективных вакцин, а противоэпизоотические мероприятия включают карантин и полное уничтожение восприимчивого поголовья в угрожаемой зоне. Данное заболевание эндемично на территории Российской Федерации с 2007 года. После первоначального заноса болезнь неуклонно распространяется, нанося непоправимый урон сельскому хозяйству нашей страны. Помимо противоэпизоотических мероприятий, направленных на ликвидацию уже имеющихся очагов заболевания, большое значение имеют мероприятия, направленные на недопущение проникновения вируса на новые территории. Для повышения эффективности этих мероприятий важно постоянно аккумулировать и всесторонне анализировать информацию о уже возникших вспышках заболевания, на основании чего появляется возможность прогнозиро-

вания направлений распространения вируса и выявление потенциально угрожаемых территорий.

Первостепенную роль в этих исследованиях играют молекулярно-генетические исследования, проводимые путём определения первичной нуклеотидной последовательности маркерных генов циркулирующих изолятов вируса АЧС, а также их филогенетический анализ.

Цель работы - провести анализ последовательностей ряда маркерных генов различных изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации в 2016 - 2017 годах.

В качестве мишеней для амплификации были выбраны гены (I73L/I329R;B602L,CD2v), в которых наблюдаются изменения в ходе персистенции вируса в восприимчивой популяции. Знание последовательностей маркерных генов позволяет существенно расширить объём получаемых эпизоотологических данных, что может помочь в отслеживании и прогнозировании новых вспышек заболевания.

Материал и методика исследований. В работе использованы двадцать три образца 10% суспензии различных органов, поступивших в ФГБНУ ФИЦ ВиМ в ходе мониторинговых исследований. Во всех исследованных образцах показано наличие генома вируса АЧС при исследовании методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение общей ДНК производили набором “ДНК-сорб” (Интерлабсервис, Россия), согласно инструкции производителя.

Амплификация последовательностей фрагментов генов I73R/I329L, B602L, CD2 производилась в соответствии с методиками, указанными в работах [Gallardo et al, 2014; Nix et al,2006].

Анализ продуктов реакции осуществлялся при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА и напряжении 150 В.

Результаты ПЦР оценивались путем обнаружения специфических полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента маркера молекулярного веса и расчетного значения длины ПЦР-продукта относительно каждого амплифицируемого фрагмента генома.

Электрофорез проводился в течение 40 минут. Результаты электрофореза учитывались на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

Очистка вырезанных из геля ПЦР-продуктов производилась с помощью коммерческого набора “Cleanup - standard” (Евроген, Россия). Постановка сиквенсовой реакции проводилась набором BigDye

terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты исследований и их обсуждение. В работах Gallardo et.al, 2014 показано, что одним из наиболее существенных в этом отношении маркерных генов является межгенный участок I73R/I329L. В данной области генома у различных штаммов и изолятов вируса АЧС наблюдается наличие или отсутствие десятинклеотидной (GGAATATATA) встройки, что является устойчивым признаком ряда изолятов, выделенных на определённой территории. Впервые изолят, содержащий встройку, был обнаружен в 2012 году. С тех пор, ареал распространения подобных ему изолятов существенно расширился. Также следует отметить, что все изоляты, на данный момент циркулирующие на территории восточно-европейских стран (Украина, Беларусь, Литва, Польша, Латвия и Эстония), обладают данной встройкой.

Другим регионом генома вируса АЧС, используемым нами для генотипирования, являлась последовательность гена, расположенного в центральной вариабельной области и кодирующего белок B602L. В последовательности данного гена может варьировать число tandemных повторов.

С целью обнаружения других вариабельных областей для некоторых изолятов также была определена последовательность фрагмента гена CD2v.

Суммарно в ходе работы были получены и проанализированы последовательности маркерных генов для 23 изолятов вируса АЧС. В результате анализа последовательностей участка I73R/I329L было выявлено, что в настоящий момент на территории Российской Федерации преимущественно циркулируют изоляты, обладающие вставкой в данной области (так называемые TRS+), сходные с изолятами, выделенными на территории Европейских стран. Однако, в ходе работы был выявлен изолят (Irkutsk/dom/2017), не содержащий данную встройку и гомологичный исходному штамму Georgia/wb/2007 (FR682468.1). Кроме того, в последовательностях региона I73R/I329L двух изолятов, выделенных в Саратовской области (Саратов 20.01.17 и Саратов 18.02.17) обнаружена дополнительная вставка, размером 10 нуклеотидов. Вместе с тем, в Саратовской области циркулируют изоляты со стандартной структурой данного участка (TRS+), что может свидетельствовать о многократном заносе вируса на данную территорию.

При анализе последовательностей гена B602L отличий по количеству tandemных повторов в центральной вариабельной области (CVR)

обнаружено не было, имеются лишь одиночные нуклеотидные замены.

Анализ последовательностей фрагментов гена CD2v показал их полную идентичность.

Заключение. Таким образом, из полученных данных можно сделать предположение о том, что изоляты вируса АЧС, обладающие дополнительной встройкой в участке I73R/I329L (TRS+) успешно вытесняют исходную форму вируса. Однако единичные вспышки, вызванные вирусом исходного типа, всё ещё регистрируются. Наличие исключительно единичных нуклеотидных замен в участке B602L и идентичность участка CD2v может свидетельствовать о большей консервативности данных регионов, по сравнению с I73R/I329L. Следует отметить, что генотипирование ни по одной из использованных в работе последовательностей маркерных генов не позволяет определить хозяина исследуемого изолята (дикие кабаны или домашние свиньи), что согласуется с данными [Goller et al,2014].

Библиографический список:

1. Gallardo, C. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe/C.Gallardo, J.Fernández-Pinero, V.Pelayo, I.Gazaev, I.Markowska-Daniel, G.Pridotkas, R. Nieto, P. Fernández-Pacheco, S. Bokhan, O.Nevolko, Z.Drozhzhe, C.Pérez, A.Soler, D. Kolbasov, M.Arias //Transbound Emerg Dis. -2017. –Vol.64(4). –P.1280-1286.
2. Goller, K.V. Tandem repeat insertion in African swine fever virus, Russia, 2012/K.V.Goller, A.S.Malogolovkin, S.Katorkin, D.Kolbasov, I.Titov, D.Höper, M.Beer, G.M.Keil, R.Portugal, S.Blome //Emerg Infect Dis. -2014. –Vol. 20(9). –P. 1544-1547.
3. Malogolovkin, A. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011/A.Malogolovkin, A.Yelsukova, C.Gallardo, S.Tsybanov, D.Kolbasov//Vet Microbiol. -2012. –Vol.17;158(3-4). –P.415-419.
4. Nix R.J. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions/ R.J.Nix, C.Gallardo, G.Hutchings, E. Blanco, L.K.Dixon //Arch Virol. -2006. –Vol.151(12). –P.2475-2494.
5. Sanna, G. Improved Strategy for Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Sardinia, Based on Analysis of p30, CD2V and I73R/I329L Variable Regions/ G.Sanna, S.Dei Giudici, D. Bacciu, P.P.Angioi,

M.Giammarioli, G.M.De Mia, A.Oggiano// Transbound Emerg Dis. -2017.
-Vol.64(4). -P1280-1286.

**ANALYSIS OF MARKER GENES OF AFRICAN SWINE FEVER
VIRUS (I73R / I329L; B602L; CD2V) ISOLATES IN THE
TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION IN 2016-2017.**

Titov I.A., Kudryashov D.A., Skhalikova M.V., Sigbatullova A.K.

Keywords: *African swine fever virus, genotyping, sequencing, marker genes.*

The analysis of nucleotide sequences of marker genes (I73L / I329R, B602L, CD2v) of twenty three isolates of the ASF virus isolated in the Russian Federation in 2016-2017 from wild boars and domestic pigs was carried out.