

Библиографический список

1. Петроченко В.И. Гельминтозы птиц / В.И. Петроченко, Г.А. Котельников М.: Колос, 1976. – с. 351.
2. Судариков В.Е. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России / В.Е. Судариков, А.А. Шигин, Ю.В. Курочкин и др. – М.: Наука, 2002. – 298 с.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИН P54, ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

А.С. Казакова, аспирант

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук

Тел/факс.: 8(49243)6-21-25, VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

E-mail anna-kazakova85@mail.ru

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), E183L (p54), сиквенс.

Статья посвящена компьютерному анализу нуклеотидной последовательности гена E183L (p54) вируса африканской чумы свиней (АЧС). В результате сравнительного выравнивания последовательностей гена E183L (p54), взятых из GenBank, и сиквенсов гена E183L (p54), определенных в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, получено разделение всех штаммов и изолятов вируса АЧС на 7 различных групп. Ряд сиквенсов гена E183L (p54) - KK-262, NVL-1, Magadi и Armenia, - публикуются впервые.

Введение.

Африканская чума свиней (АЧС) известна почти на протяжении 100-летия как природно-очаговая вирусная инфекция диких африканских и домашних свиней, а также кабанов[1]. Одним из важных моментов в изучении патогенеза АЧС является отсутствие продукции вируснейтрализующих антител при течении инфекции. Известно, что при репродукции в альвеолярных макрофагах свиньи высоковирулентного изолята E70 синтезируется 57 кислых и 43 основных вирусспецифических белков [2].

Сложность антигенной структуры вириона, обусловленная синтезом более 100 полипептидов и генетическая гетерогенность ДНК возбудителя не позволяют до конца определить функциональную роль целого ряда вирусных белков. Структурный белок p54 – трансмембранный гликопротеин кодируется геном E183L, выявляется на позднем этапе репродукции вируса. Этот белок обеспечивает прикрепление вируса АЧС к клетке хозяина. Молекулярные массы его полипептидной части у различных вирусных изолятов варьируют между 24 и 28 кДа [3].

Целью наших исследований являлось проведение анализа нуклеотидной структуры гена, кодирующего p54 вируса АЧС различных штаммов и изолятов и группирование различных штаммов на основе анализа последовательностей гена E183L.

Материалы и методы исследований.

Подбор праймеров, состав компонентов для проведения ПЦР и режим постановки реакции опубликованы ранее [4].

Суммарную ДНК из вирусосодержащего материала выделяли фенольно-детергентным методом.

В качестве матрицы для получения и накопления ПЦР-продукта использовали ДНК вирулентных штаммов и изолятов вируса АЧС Magadi и Armenia с концентрацией 100 мкг/мл по 1 мкл на реак-

цию. Также в работе использованы ДНК авирулентных штаммов и изолятов вируса АЧС - КК-262, NVL-1, полученных ранее в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в результате адаптации вируса дикого типа к перевиваемым культурам клеток CV-1, Vero и РРК-66b.

Для очистки ПЦР-продукта от агарозного геля для проведения анализа сиквенса использовали Набор реагентов для извлечения ДНК из агарозных гелей (Fermentas).

Сравнительный анализ опубликованных в GenBank первичных последовательностей геномов изолятов возбудителя АЧС Lisbon-57, Katanga-67 (II серотип), Mozambique-79, Tengani-62 (III серотип), France-64/32, Espana-70, Brasilia-78, Malta, Angola-70, Ba71V (IV серотип), Uganda-64 (VII серотип), Georgia 2007/1 (VIII серотип) и полученных нами результатов секвенирования ПЦР-продуктов гена E183L (p54) штаммов КК-262, NVL-1 (II серотип), Magadi (VII серотип) и Armenia (VIII серотип) проводили с помощью программы BioEdit 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение.

На первом этапе работы было проведено выделение ДНК вируса АЧС из инфицированной культуры клеток, затем проводили постановку ПЦР с детекцией наличия продуктов амплификации методом электрофоретического разделения в 1,5% геле агарозы.

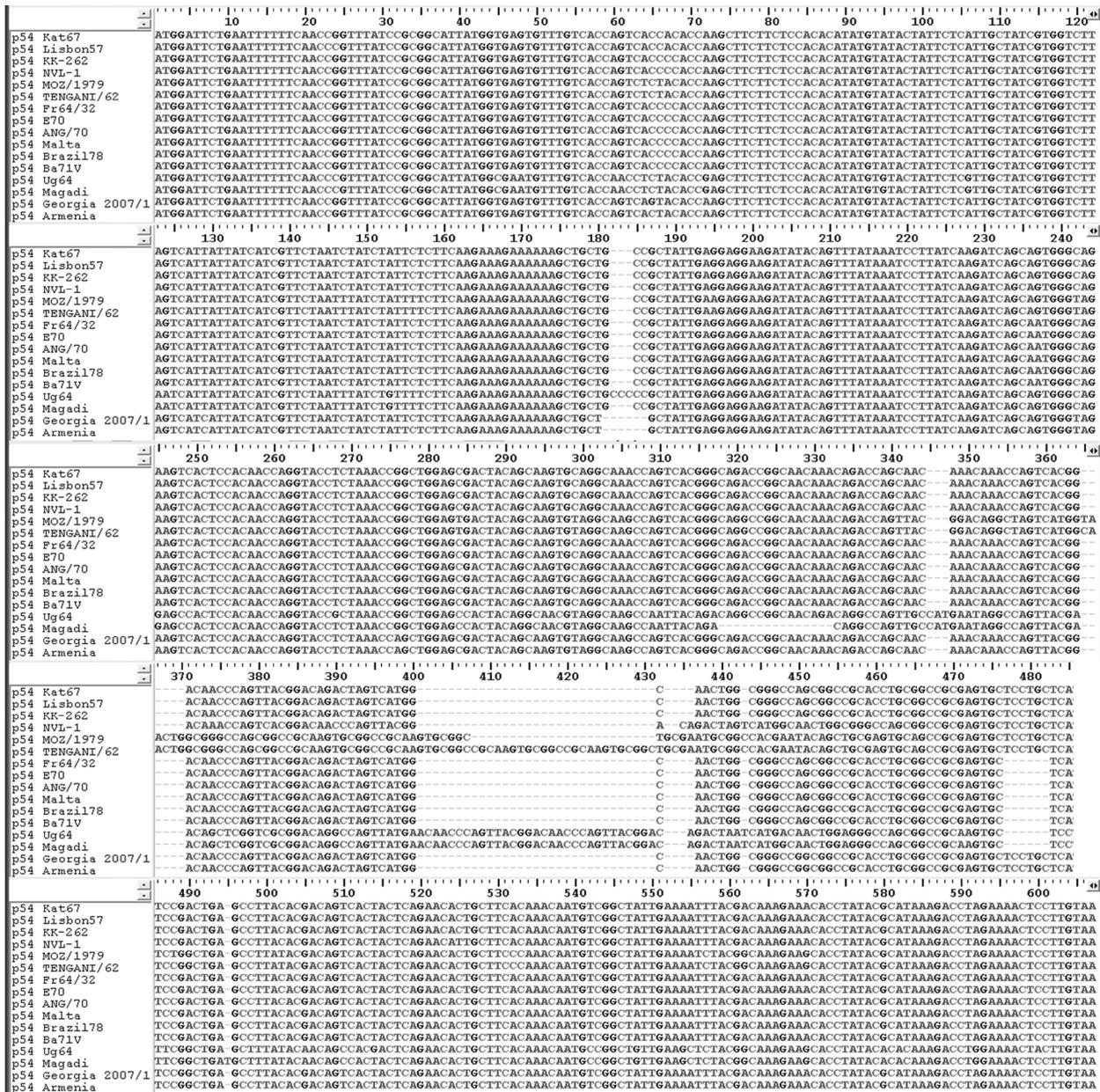


Рисунок. Группирование нуклеотидных последовательностей E183L (p54) различных изолятов и штаммов на основе компьютерного анализа

Далее продукты амплификации гена, кодирующего р54 вируса АЧС штаммов и изолятов КК-262, NVL-1, Magadi и Armenia, были элюированы из агарозного геля путем отжимания через стекловолочный фильтр. В последующем проводили очистку ампликонов от буфера для нанесения, примеси солей и бромистого этидия с использованием ДНК-сорбента (Fermentas). Сиквенс проводился в ГНУ ВНИВВиМ Россельхозакадемии Малоголовкиным А.С.

Выравнивание нуклеотидной последовательности гена E183L (р54) различных штаммов и изолятов вируса АЧС представлено ниже (Рисунок).

Результаты выравнивания показали высокую гомологию структуры гена E183L для изолятов и штаммов, имеющих происхождение из одной географической зоны (Таблица).

Очевидно, что циркуляция возбудителя АЧС на чувствительных животных поддерживает стабильность его генома, что согласуется с данными F. Rodriguez et.al. [3], которые установили, что максимальные генетические изменения происходят в структуре гена E183L при длительном пассировании в перевиваемых культурах клеток, таких как CV-1, Vero и других линиях, не создающих перmissive условия для его репликации. В наших исследованиях таким штаммом является NVL-1, адаптированный к репродукции в культуре клеток CV-1 и прошедший на ней более 50 пассажей, отнесенный в отдельную III геногруппу.

Таблица. Распределение штаммов и изолятов вируса АЧС по геногруппам

| Геногруппа | Штаммы и изоляты вируса АЧС | Географическая зона происхождения |
|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| I | Lisbon-57, Katanga-67 | Европа |
| II | КК-262 | Западная Африка |
| III | NVL-1 | Западная Африка |
| IV | Mozambique-79, Tengani-62 | Юго-Восточная Африка |
| V | France-64/32, Espana-70, Malta, Ba71V | Европа |
| | Brasilia-78 Angola-70 | Южная Америка Юго-Западная Африка |
| VI | Uganda-64, Magadi | Восточная Африка |
| VII | Georgia 2007/1, Armenia | Кавказский регион |

Заключение.

Все исследуемые последовательности штаммов и изолятов вируса АЧС, взятые из GeneBank, и те, что секвенированы в институте, были разделены по нуклеотидным последовательностям на 7 геногрупп: изолят Armenia, выделенный на территории Армении, по данным проведенного анализа относится к одной геногруппе со штаммом Georgia 2007/1 (Грузия).

Представленные данные нуклеотидных последовательностей гена E183L (р54) штаммов КК-262, NVL-1, Magadi и Armenia публикуются впервые.

Группирование различных изолятов и штаммов вируса АЧС по нуклеотидным последовательностям E183L (р54) позволяет выявить общие закономерности соответствия структуры и функций белков вируса АЧС, что крайне важно для разработки средств профилактики и защиты от такой особо опасной болезни свиней, как АЧС[5].

Библиографический список.

1. Montgomery R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) // J. Comp. Pathol. – 1921. - № 34. – P. 159-191.
2. Rodriguez, J.M. African swine fever virus-induced polypeptides in porcine alveolar macrophages and in Vero cells: two-dimensional gel analysis / J.M. Rodriguez, M.L. Salas, J.F. Santaren // Proteomics. - 2001. – Vol. 1, № 11. - P. 1447-1456.
3. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the african swine fever virus envelope

protein p54 / F. Rodriguez, C. Alcaraz, A. Eiras [et al.] // J. Virol. – 1994. - № 68 (11). – P. 7244-7252.

4. Казакова, А.С., Власова, Н.Н. Клонирование гена E183L (p54) вируса африканской чумы свиней/ А.С. Казакова, Н.Н. Власова/ Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Т.IV. Актуальные вопросы ветеринарной медицины, биологии и экологии: материалы II-ой Междунар. науч.-практ. конф./УГСХА. - Ульяновск, 2010. – С.81-85.

5. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Жуков А.Н., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М. Иммуно-биологические и молекулярно-генетические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в Российской Федерации (09-04-13759) Материалы Всероссийской научной конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России 14-15 апреля 2010 года». – РФФИ: Москва, 2010. – С.94-98.

УДК 619:578.832.1:616.98:636.5

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А ПТИЦ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ И ИММУНОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.С. Казарян, м.н.с., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области;
тел.: 8 (49243) 6-2125; kazaryanas@mail.ru

В.Н. Пономарёв, д.в.н., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области
8 (49243) 6-2125.

М.Ю. Щелканов, д.б.н., доцент, ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития Рос-
сии; тел.: 8 (499) 190-3052; adorob@mail.ru.

А.Т. Кушнир, д.в.н., профессор, ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области;
тел.: 8 (49243) 6-2125.

Д.В. Куренков, к.б.н., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области
8 (49243) 6-2125; dmit.kurenkov@gmail.com.

Е.А. Гущина, к.б.н., ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России;
тел.: 8 (499) 190-3044; adorob@mail.ru.

Д.К. Львов, д.м.н., профессор, академик РАМН, ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрав-
соцразвития России; тел.: 8 (499) 190-3074; dk_lvov@mail.ru.

Ключевые слова: вирус гриппа А, ортомиксовирусы, птицы, электронная микроскопия, им-
муноэлектронная микроскопия.

В работе проведены результаты успешной верификации метода электронной и иммуноэ-
лектронной микроскопии для индикации и идентификации вируса гриппа А птиц на модели высоко-
вирулентного штамма A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1).

Введение.

Грипп (классическая чума) птиц – остро протекающая, высококонтагиозная болезнь домашних, синантропных и диких птиц. Заболевание протекает в виде эпизоотий с поражением желудочно-кишечного тракта, органов респираторного тракта, сосудистой и центральной нервной систем. Возбудителями болезни являются высоковирулентные штаммы вируса гриппа А – РНК-содержащего вируса из семейства *Orthomyxoviridae*, рода *Influenza A virus* [7, 14].

Дикие птицы водно-околоводного экологического комплекса (в первую очередь пластинчатоклювые *Anatidae* и чайковые *Laridae*) являются природным резервуаром вируса гриппа А [12, 13]. Благодаря высокой экологической пластичности, этот вирус способен проникать в популяции других хозяев