

УДК578.53

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАКЦИННОГО ШТАММА И ПОЛЕВОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ

Шкаликова М.В., студентка 5 курса факультета ветеринарной медицины  
Научные руководители – Титов И.А. \*, кандидат биологических наук,  
Васильева Ю. Б. \*\*, кандидат ветеринарных наук, доцент

\* ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
\*\* ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**Ключевые слова:** эпизоотическая диарея свиней (ЭДС), секвенирование, М сегмент, ПЦР, филогенетический анализ.

*Работа посвящена филогенетическому анализу вакцинного штамма и полевого изолята вируса эпизоотической диареи свиней. На основе проведенного филогенетического анализа было установлено, что вакцинный штамм ИС гомологичен вакцинному штамму CV777, а полевой изолят БС-08 не входит ни в одну из сформированных групп.*

Эпизоотическая (эпидемическая) диарея свиней (ЭДС) – остро протекающее, высококонтагиозное заболевание свиней, характеризующееся изнурительной диареей, дегидратацией организма и высокой смертностью.

Возбудителем ЭДС является РНК-содержащий вирус, принадлежащий порядку *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Coronavirinae*. На основе антигенных и генетических критериев вирус ЭДС вместе с коронавирусами человека NL63 и 229 E и несколькими коронавирусами летучих мышей принадлежат роду *Alphacoronavirus*. [2, 3]

Заболеванию подвержены свиньи всех возрастных групп, но наибольшей восприимчивостью обладают новорождённые поросята до двухнедельного возраста, среди которых смертность достигает от 30 до 100%. С послеотъемного возраста летальный исход среди свиней составляет 1 – 3%. [4]

Возбудитель инфекции может передаваться через контаминированные вирусом ЭДС корма, особенно содержащие продукты убоя свиней, а также через сперму, воду, навоз. Кроме того, в хозяйство вирус может заноситься с закупаемыми племенными свиньями, транспортными средствами, обувью обслуживающего персонала и предметами ухода за животными. Возможен аэрогенный путь передачи возбудителя. [7]. Особенностью ЭДС считается тропизм вируса *in vivo* – размножение вируса ЭДС предпочтительно в энтероцитах крипт тонкого кишечника свиней. [5]

ЭДС представляет собой серьезную угрозу свиноводству РФ. Прогнозная ориентация по болезни предполагает возможность возникновения серьезных эпизоотических вспышек и эпизоотий в пределах регионов с высокой концентрацией свиноголовья: Центральный, Северо-Западный, Приволжский, Южный, Северо-Кавказский, Крымский федеральные округа. Эпизоотические вспышки болезни могут возникать в пределах пригородных зон промышленных центров Уральского, Сибирского и Дальневосточного федеральных округов. В период эпизоотий территориальный охват может включать в течение года неблагополучия 15-20 субъектов административного деления, потери поголовья – 1-2 млн. гол. Вероятность возникновения такой ситуации оценивается в 1 – 5 %. [8]

Все штаммы вируса ЭДС, которые были выделены в различных странах мира, по своей антигенной структуре практически идентичны и представляют один серотип вируса, но в полевых условиях обладают различной вирулентностью. Значительные экономические потери, причиняемые ЭДС, послужили основой для изучения этого заболевания.

В связи с этим, большую актуальность приобретают молекулярно – генетические исследования, позволяющие дифференцировать различные штаммы и изоляты вируса ЭДС с целью получения молекулярно – эпизоотологической информации о циркулирующих изолятах и применяемых вакцинных штаммах.

**Целью нашей работы** является проведение секвенирования и филогенетического анализа различных участков генома вакцинных штаммов и полевых изолятов с целью их генетической характеристики.

#### **Материалы и методы.**

**Вирусы.** В работе использованы следующие имеющиеся в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии изоляты и штаммы вируса ЭДС:

- вакцинный штамм ИС(по названию страны первичного выделения вирулентного вируса – Испания)использовали в виде культуральной суспензии.

-полевой изолят БС-08, выделенный из патологического материала от больных поросят 3-5-суточного возраста, полученные с сентября по декабрь 2008 года в свиноводческом хозяйстве закрытого типа в западном регионе России.[6]

На первом этапе работы проводилось **выделение и очистка нуклеиновых кислот.**

Следующим этапом было **проведение ОТ-ПЦР** с целью наработки фрагментов М сегмента генома вируса ЭДС были использованы праймеры.[1]

Для проведения всех этапов различных вариантов ОТ-ПЦР использовали термоциклеры «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва) или Махугене (Ахугене, Китай) и пробирки емкостью 0,6 см<sup>3</sup> и 0,2 см<sup>3</sup>.

От-ПЦР для выявления РНК вируса ЭДС проводили с предварительной денатурацией со специфическими праймерами.[2] Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42°C. Затем была приготовлена смесь для амплификации, встряхивали пробирки на вортексе, все капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек. Переносили пробы в амплификатор и проводили ПЦР при следующих температурных режимах:

- 1 цикл при 95°C 2 минуты;
- 30 циклов при 94°C 30 секунд;
- 53°C 60 секунд;
- 72°C 60 секунд;
- 1 цикл 72 °C 5 минут.

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

Электрофорез проводили в течение 30 минут. Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Регистрацию полученных результатов проводили с помощью гель-документирующей системы.

**Нуклеотидное секвенирование** фрагментов М сегмента генома вируса ЭДС проводили с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров.[1] Выделение специфических продуктов амплификации из агарозного геля или реакционной смеси осуществляли коммерческим набором для выделения нуклеиновых кислот QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Германия), с последующей реамплификацией фрагментов при помощи компонентов «BigDye Terminator v. 3.1.» («Applied Biosystems», США). Реакцию с дефектными флуоресцентно-мечеными трифосфатами проводили с прямым и обратным праймерами при следующих температурных режимах: 95° С-10 сек., 50 °С – 20 сек., 60 °С – 4 мин (25 циклов). Очистку продуктов сиквенсовой реакции проводили с помощью коммерческого набора BigDye X Terminator Purification Kit («Applied Biosystems», США).

Секвенирование проводили в автоматическом секвенаторе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США).

**Филогенетический анализ М сегмента генома вируса ЭДС.** На основании полученных последовательностей М сегмента генома вируса ЭДС с помощью программы BioEdit 6.0 был произведен их филогенетический анализ. Для построения филогенетической дендрограммы использована программа Mega 5.0.

**Результаты.** Результаты ПЦР оценивали путем обнаружения специфических полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента маркера молекулярного веса и расчетного значения длины ПЦР-продукта.

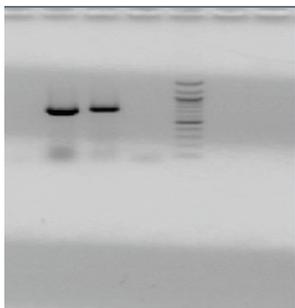


Рисунок 1 –электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов М сегмента вакцинного и полевого штамма вируса ЭДС. Длина фрагмента составляет примерно 706 п. о.

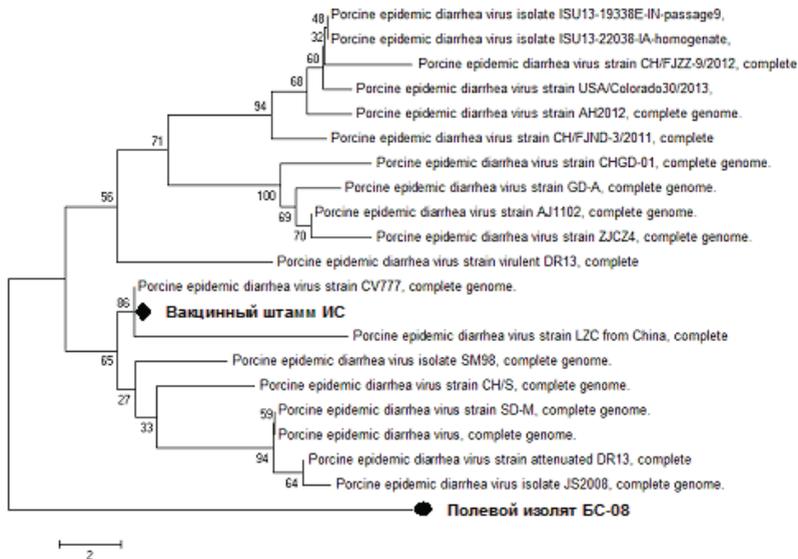


Рисунок 2 – филогенетическая дендрограмма, построенная на основе последовательностей фрагмента М сегмента генома вируса ЭДС. Красным цветом отмечен вакцинный штамм ИС, голубым цветом отмечен полевой изолят БС-08.

Дендрограмма на основе последовательностей М сегмента вируса ЭДС была построена методом «ближайших соседей» с bootstrap = 500. В целях повы-

шения достоверности произведённого анализа в построенную дендрограмму был включён ряд последовательностей М сегмента генома вируса ЭДС, взятых из международной базы данных GenBank.

**Вывод:** на основе проведенного филогенетического анализа участков М сегментов полевого изолята и вакцинного штамма, выделенных в Российской Федерации, можно сделать вывод о том, что вакцинный штамм ИС, используемый в Российской Федерации, гомологичен по данному участку вакцинному штамму CV777. Полевой изолят БС-08 не входит ни в одну из групп, образованную американскими или китайскими вирулентными штаммами данного вируса, а формирует отдельный кластер. На основании этого можно предположить, что данный изолят не занесен из других регионов, а является эндемичным. Для определения их филогенетического родства с иностранными изолятами требуется более детальный анализ их генома.

#### **Библиографический список:**

1. Ruiqin Sun. Genetic Variability and Phylogeny of Current Chinese Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains Based on *Spike*, *ORF3*, and *Membrane* Genes / Zhangming Leng, Shao-Lun Zhai, Dekun Chen, and Changxu Song. // Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal Volume 2014,
2. Gonzales, J.M. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae / Gonzales J.M., Gomez-Puertas P., Cavanagh D., Gorbalenya A.E., Enjuanes L. // Arch. Virol. - 2003. - v.148. - P.2207-2235.
3. Sanchez, C.M. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus / Sanchez C.M., Jimenez G., Laviada M.D., Correa I., Sune C., Bullido M. J., Gebauer F., Srnerdou C., Callebaut P., Escribano J.M., Enjuanes L. // Virology. - 1990. - v.174. - P.410-417.
4. Pensaert, M. Porcine epidemic diarrhea / Pensaert M. //In: B.E. Straw et al. (eds) Diseases of Swine, (9th Ed., Blackwell, Ames, 2006), P.367-372.
5. Pospischil, A. Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with enzootic diarrhoea virus (EVD): Comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections / Pospischil A., Hess R.G., Bachmann P.A. //Zentralbl. Veterinarmed.B. - 1981.- v.28. - P.564-577.
6. Стрижакова О. М. Выделение и идентификация вируса эпизоотической диареи свиней при вспышке в крупном свиноводческом хозяйстве // Сельскохозяйственная биология, 2013, №4, с. 65 – 69.
7. [fsvps.ru/fsvps/iac/messages/1754.html](http://fsvps.ru/fsvps/iac/messages/1754.html)
8. <http://vetupkrov.ru/index.php/17-novosti/79-epizooticheskaya-diareya-svinej-smertelno-opasnaya-bolezn-porosyat>.

9. Васильев, Д.А. Разработка параметров количественного определения бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* на основе мультиплексной пцр в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных». Покров. - 2014. - С. 91-96.
10. Золотухин С.Н. Изучение чувствительности *E.coli* к колифагам / С.Н. Золотухин, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. Ульяновск. - 2001. - № 11. - С. 59.
11. Золотухин С.Н. Чувствительность патогенных энтеробактерий, выделенных при диареях молодняка животных к антибиотикам и специфическим бактериофагам / С.Н. Золотухин, А.С. Мелехин, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук, Н.И. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, Б.М. Коритняк, Е.А. Бульканова // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных. Ульяновск. - 2006. - С. 233-236.
12. Золотухин С.Н. Выделение и селекция клонов бактериофагов патогенных энтеробактерий / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук, Н.И. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, Б.М. Коритняк, Е.А. Бульканова, Н.А. Феоктистова, Е.Н. Пожарникова, А.С. Мелехин, Н.Г. Барт, Н.П. Катмакова // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных. Ульяновск. - 2006. - С. 227-230.
13. Курьянова Н.Х. Проблемы биологической диагностики орнитобактериоза / Н.Х. Курьянова, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Научный вестник Московского государственного горного университета. Москва. - 2009. - С. 170.
14. Золотухин С.Н. Штаммы бактериофагов малоизученных патогенных энтеробактерий и их практическое применение / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук, Л.П. Пульчеровская, Н.И. Молофеева, Б.М. Коритняк, А.Ю. Кузнецов, Е.А. Бульканова, Е.Н. Пожарникова, Н.А. Феоктистова, А.С. Мелехин, С.В. Ленев // Научные разработки и научно-консультационные услуги Ульяновской ГСХА. Информационно-справочный указатель. Ульяновск. - 2006. - С. 45-49.
15. Потатуркина-Нестерова Н.И. Атомно-силовая микроскопия как метод исследования в микробиологии / Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова, А.В. Даньшина // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 3. - С. 316.
16. Елистратова Л.Л. Современное состояние проблемы демодеккоза / Л.Л. Елистратова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Нестеров // Фундаментальные исследования. - 2011. - № 9-1. - С. 67-69.13. Потатуркина-Нестерова Н.И.

Изменение вирулентных свойств урогенитальных энтерококков в условиях межмикробных взаимоотношений / Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова, М.Н. Артамонова, Е.Б. Хромова, О.Е. Хохлова, Н.В. Трофимова, О.В. Теплякова, И.А. Кочергина // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 1. - С. 8.

17. Белозерова Е.А. Влияние хронического поступления солей меди, цинка и свинца на микробиологический баланс толстой кишки в условиях эксперимента / Е.А. Белозерова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, Е.С. Климов. -Токсикологический вестник. - 2007. - № 4. - С. 26-30.
18. Яцишина С.Б. Применение мультиплексной ПЦР для идентификации вирулентных форм возбудителя сибирской язвы / С.Б. Яцишина, И.Л. Обухов, Л.С. Саленко, Б.И. Шморгун и др. // Сб. тезисов Генодиагностика инфекционных заболеваний. Всеросс. науч.-практич. Конференция. – 2002.

## **PHYLOGENETIC ANALYSIS OF VACCINE STRAINS AND FIELD ISOLATES OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS**

Shkalikova M. V., Titov I. A.

**Key words:** *porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), sequencing, M segment, PCR, phylogenetic analysis.*

**Summary.** *The paper is devoted phylogenetic analysis of the vaccine strain and field isolate porcine epidemic diarrhea virus. Based on phylogenetic analysis, it was found that the vaccine strain IS homologous to the vaccine strain CV777, a field isolate the BS - 08 is not included in any of the existing groups.*