

УДК 619:578:636.4(476)

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹**Ломако Ю.В.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Сергеев Г.В.**, кандидат химических наук²**Лемиш А.П.**, кандидат ветеринарных наук³**Герасимчук С.С.**, ветврач³**Бузюма А.А.**, ветврач³**Потапчук Д.В.**, ветврач³**Пономарев А.И.**, ветврач³**Савельева Т.А.**, кандидат ветеринарных наук, доцент⁴¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск²ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск³ЗАО «Консул», г. Минск⁴РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

В статье приведены результаты частичного секвенса изолятов вируса репродуктивно-респираторного синдрома, выделенных в Республике Беларусь. Анализ последовательностей указывает на значительный полиморфизм изолятов в наиболее консервативных рамках считывания (ORF6-7). Выделенные изоляты относятся к европейскому типу, подтип 3.

Summary

The article presents the results of a partial sequence isolated in the Republic of Belarus of isolates of the virus of reproductive and respiratory syndrome. Sequence analysis indicates significant polymorphism of isolates in the most conservative reading frames (ORF6-7). Isolated isolates belong to the European type, subtype 3.

Поступила в редакцию 23.03.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром официально зарегистрирован на территории Республики Беларусь в 1997 году. Заболевание отнесено к списку группы Б Международного эпизоотического бюро (МЭБ).

Специфичность заболевания (болеют только свиньи), вариабельность самого вирусного агента, разнообразная клиническая картина (протекает в репродуктивной и респираторной формах), поражение значительной части поголовья свиней (основные свиноматки и молодняк послеотъемного периода) – все это затрудняет постановку диагноза [1].

Современные методы диагностики позволяют выявлять вирус методом поли-

меразной цепной реакции в короткие сроки, что существенно упрощает и ускоряет решение вопроса постановки диагноза и разработки противоэпизоотических мероприятий. Однако в связи с высокой вариабельностью вирусных изолятов вопрос вакцинации и циркуляции местных изолятов в хозяйствах стоит остро, поэтому важно определять, какими изолятами инфицированы свиньи в том или ином хозяйстве. Использование частичного секвенс-анализа позволяет определить родство полученных изолятов с уже существующими расшифрованными геномами [2].

Вirus PRSS высоковариабелен и представляет собой одноцепочный РНК-вирус, геном которого представлен 9 рам-

ками считывания. На основании генетических антигенных и патогенных различий вирус РРСС делится на 2 генотипа, нуклеотидная идентичность которых составляет не более 70 % (европейский генотип, или тип 1, и американский генотип, или тип 2) [3].

Изначально считалось, что эти два генотипа формировали достаточно однородные группы, схожие с первыми изолятами: для европейского типа – с вирусом Le lystad, для американского – с VR2332 [4, 5].

Однако европейские генотипы вируса имеют четкую географическую разграниченность вдоль польской границы. На территории Республики Беларусь циркулируют изоляты, относящиеся к европейскому генотипу, но в силу отличий в последовательностях ОРС 5 и значительного полиморфизма в ОРС7 белорусские изоляты выделены в отдельные подтипы 2–4 (2006 г.). Наиболее известным штаммом, обладающим высокой вирулентностью, официально зарегистрированным в онлайн-базе данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), является штамм JF802085.1 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena. Его полный геном доступен в NCBI.

Целью нашей работы было выделить вирус РРСС из патологического материала, взятого в хозяйствах Республики Беларусь, и сравнить выделенные геномы с зарегистрированными геномами вируса РРСС в базах данных NCBI, определить их сродство по ОРС 6-7.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами были отобраны пробы патологического материала из 14 хозяйств Республики Беларусь, в которых за период 2015–2018 гг. методом ПЦР выявлялся вирус РРСС.

В данных хозяйствах инфекция протекала с классическими признаками репродуктивно-респираторной патологии. Пробы (патматериал) отбирались от поросят в возрасте 45–65 дней.

Суммарную РНК выделяли согласно инструкции набором Рибопреп (фирма Ам-

плисенс, Россия). Праймеры подбирали к наиболее консервативному участку генома вируса РРСС, кодирующему протеин М и нуклеокапсидный белок N. Участок ОРС 6-7 (5-*TACATTCTGGCCCCTGCCCCAC-3*, 5*CACAGCTGATTGACTGGCTGGCCA-3*), праймеры синтезировали в ОДО «Праймтех» (Минск, Беларусь). Обратную транскрипцию (ОТ-ПЦР) суммарной РНК проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси. Для синтеза кДНК смешивали в 5х буфере для ОТ-ПЦР 2 мкл суммарной РНК с 0,5мкМ обратного праймера в присутствии 10 U рибонуклеазного ингибитора (Fermentas, Литва), 50 U ревертазы (Fermentas, Литва) и 1 мкл 10 mM смеси дНТП. Смесь инкубировали согласно инструкции 1 час при 42 °С, а затем инактивировали ревертазу в течение 10 минут при 70 °С. Амплификацию ПЦР продукта проводили в общем объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл кДНК, 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 3 mM хлорида магния и 1 ЕД Tag-полимеразы (ОДО Праймтех, Минск). Использовали следующий режим амплификации: 95 °С – 5 минут, затем 35 циклов 95 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 20 секунд.

Образцы ПЦР-продуктов были проанализированы методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Учет результатов проводили на приборе Gel-Doc (фирма Bio-Rad). ДНК-фрагменты, соответствующие по массе 274 п.н., были вырезаны из геля и очищены с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit. Постановку реакции секвенирования осуществляли, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирование каждого образца проводили на базе ИБОХ (Минск). Очистку сиквенс-продуктов проводили, используя набор Applied Biosystems BigDye XTerminator Purification Kit. Анализ сиквенс-продуктов проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm) и с помощью программы Blas и Unigenet.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

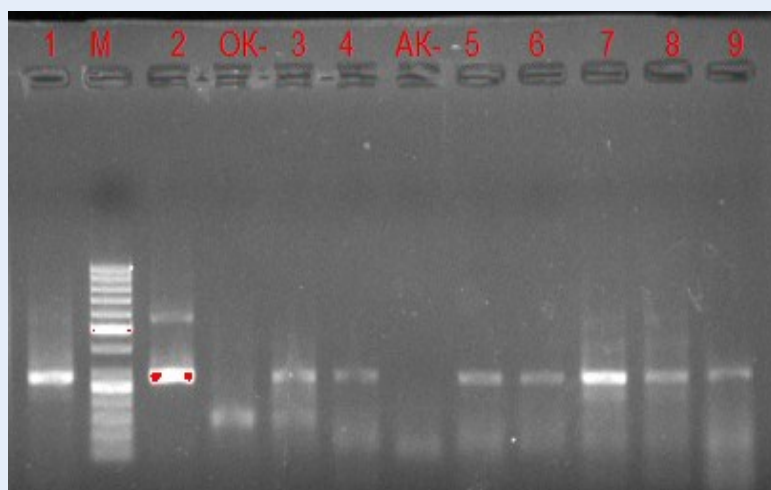
Список свиноводческих хозяйств, в которых отбирались пробы патматериала, представлен в таблице 1.

Таблица 1. – Хозяйства и возраст поросят, от которых был отобран патологический материал

Наименование хозяйства	Возраст поросят, дней
ЗАО «Турец», Минская область	55
ОАО СГЦ «Западный», Брестская область	60
Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс», Гродненская область	65
ОАО «Беловежский», Брестская область	65
ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"», Витебская область	45
ЗАО «Гудевичи», Гродненская область	55
ОАО «Тарасово», Минская область	50
КСУП «Дотишки», Гродненская область	55
СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"», Минская область	65
КПС «Восточный», Брестская область	60
СГЦ «Заднепровский», Витебская область	45
ОАО «Барановичхлебопродукт», Брестская область	55
ОАО «Дрогичинский КЗ» СК «Сухое», Брестская область	65
С-к «Заря», Гомельская область	55

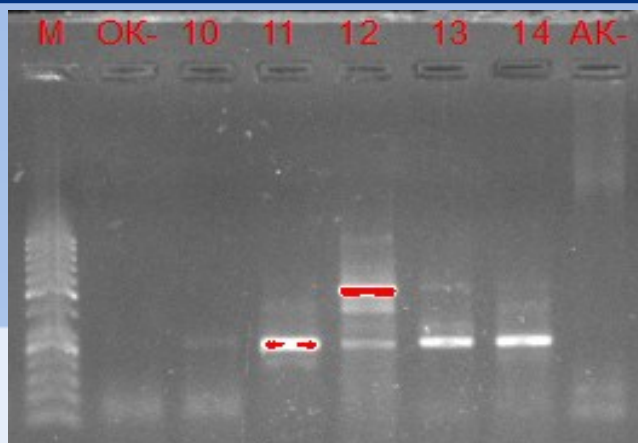
Как видно из таблицы 1, для сравнительного анализа изолятов вируса РРСС нами были отобраны пробы из хозяйств 5 областей Республики Беларусь. Результаты полимеразной цепной реакции с пробами

патологического материала представлены на рисунках 1, 2. Полученные данные подтверждают значительное распространение вируса РРСС по всей территории страны.



1 – ЗАО «Турец»; М – маркер молекулярного веса (Fermentas, 50 bp); 2 – ОАО СГЦ «Западный»; ОК – отрицательный контроль обратной транскрипции; 3 – Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс»; 4 – ОАО «Беловежский»; АК – отрицательный контроль амплификации; 5 – ОАО Агрокомбинат «Юбилейный»; 6 – ЗАО «Гудевичи»; 7 – ОАО «Тарасово»; 8 – КСУП «Дотишки»; 9 – СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»

Рисунок 1. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации со специфическими праймерами в отношении участка генома вируса РРСС (длина продукта амплификации 274 п.н.), полученных из патологического материала, отобранного от свиней (фото)

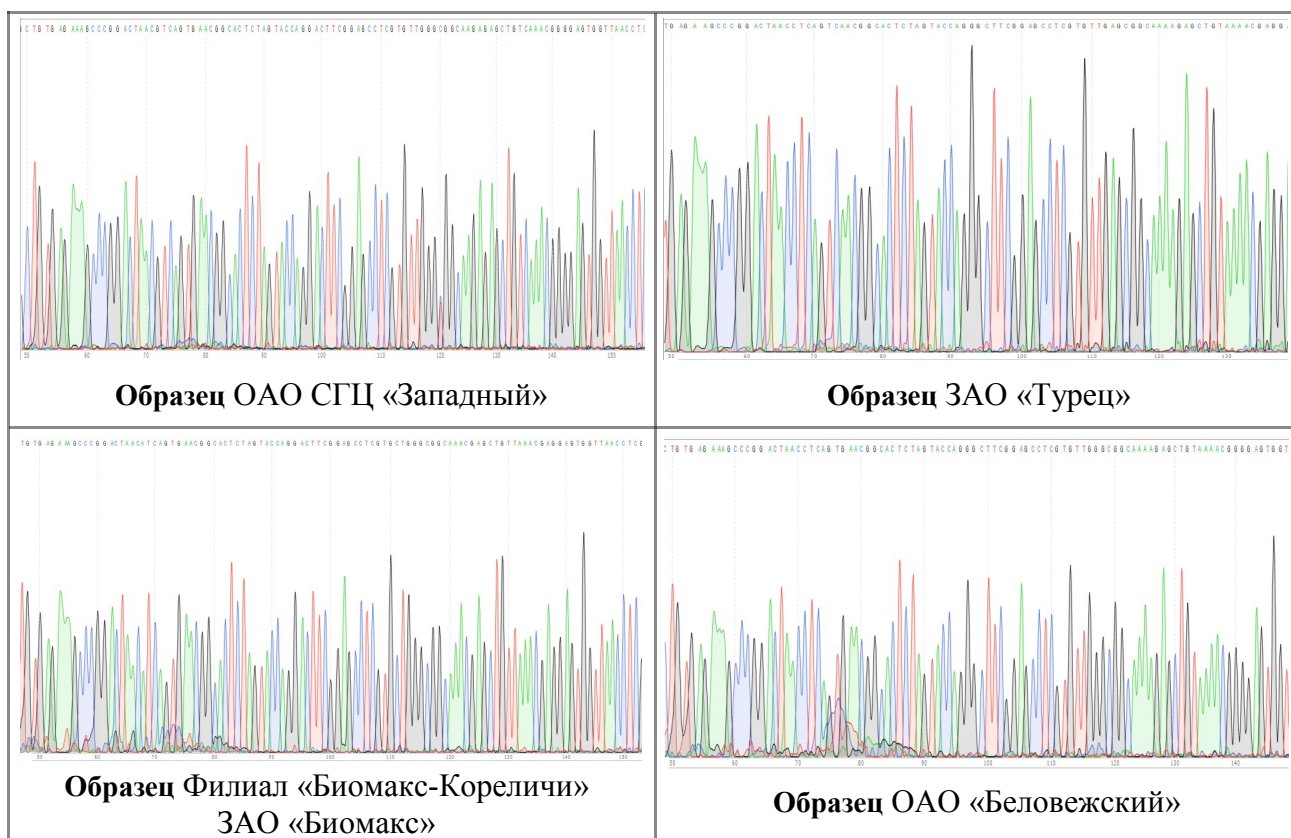


М – маркер молекулярного веса (Fermentas, 50 bp); ОК – отрицательный контроль обратной транскрипции; 10 – КПС «Восточный»; 11 – СГЦ «Заднепровский»; 12 – ОАО «Барановичихлебопродукт»; 13 – ОАО «Дрогиченский КЗ» СК «Сухое»; 14 – С-к «Заря» Мозырь; АК – отрицательный контроль амплификации

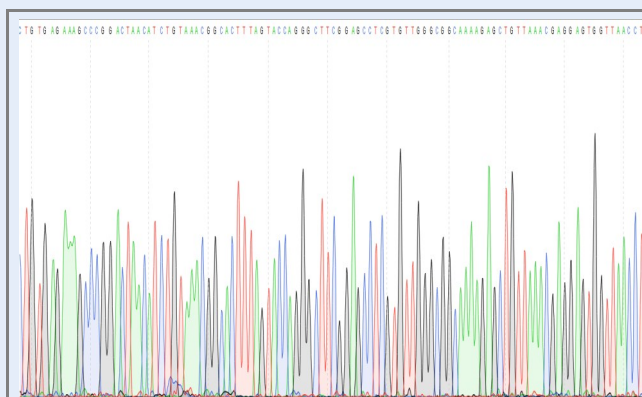
Рисунок 2. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации со специфическими праймерами в отношении участка генома вируса РРСС (длина продукта амплификации 274 п.н.), полученных из патологического материала, отобранного от свиней (фото)

Затем вырезанные ДНК фрагменты с молекулярным весом 274 п.н. были переданы в ИБОХ для проведения секвенс-анализа. Полученные секвенограммы представлены в таблице 2.

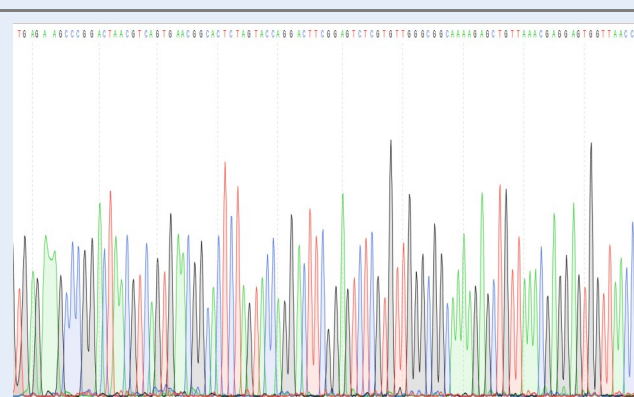
Таблица 2. – Секвенограммы ДНК-фрагментов



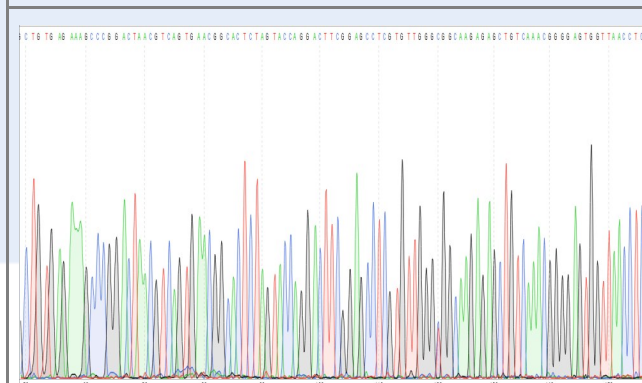
Продолжение таблицы 2



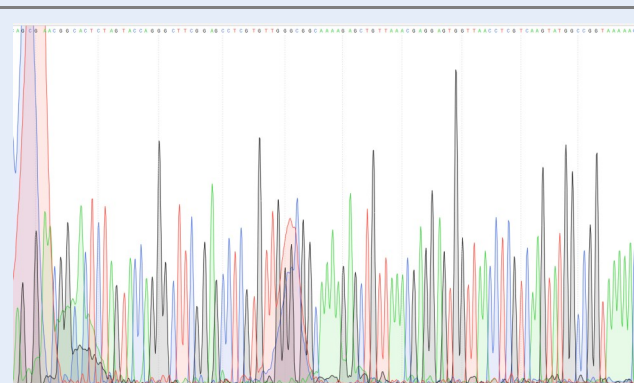
Образец ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"»



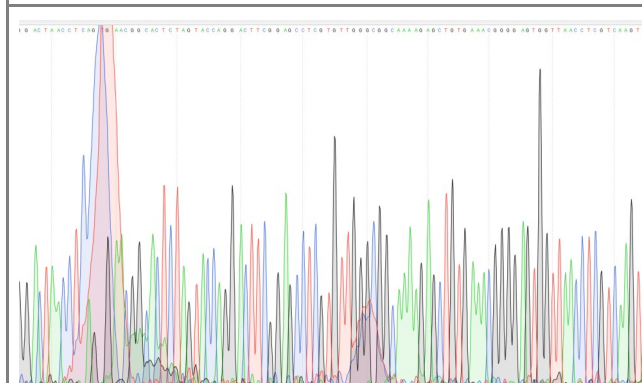
Образец ЗАО «Гудевичи»



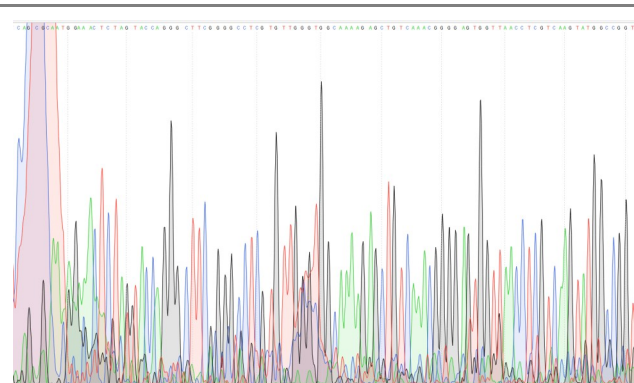
Образец СГЦ «Заднепровский»



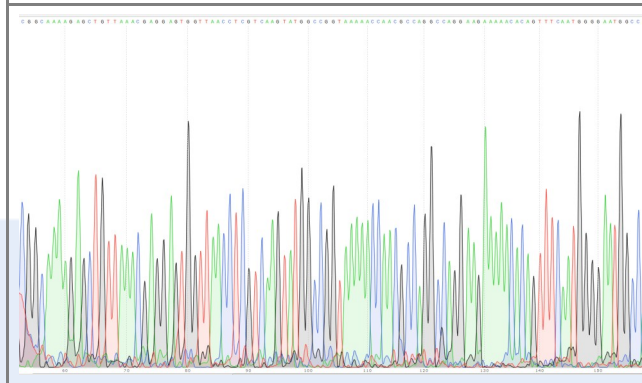
Образец ОАО «Тарасово»



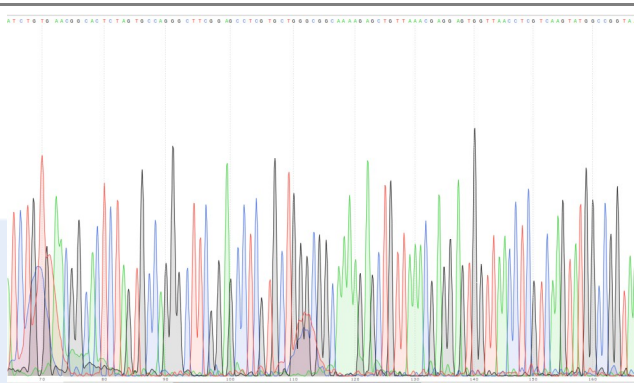
Образец КСУП «Дотишки»



Образец СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»

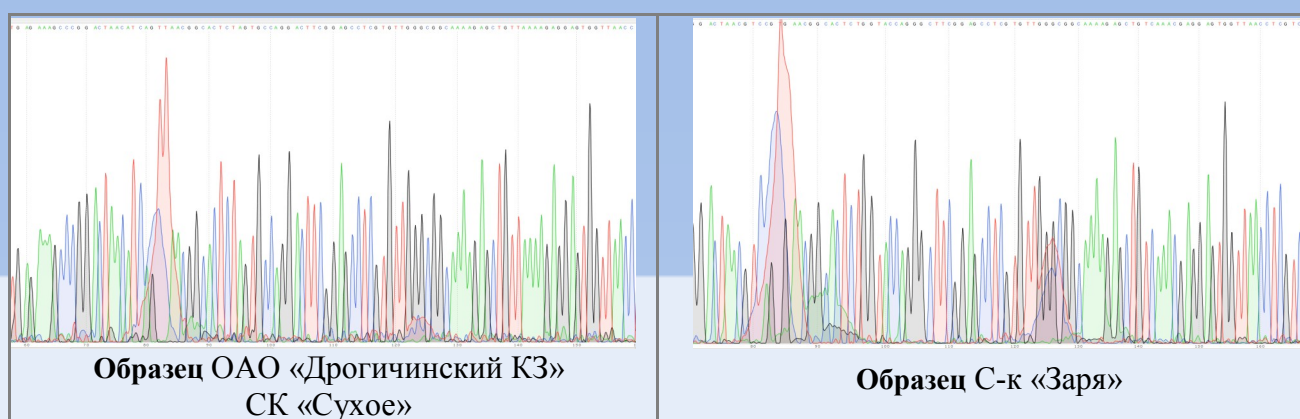


Образец КПС «Восточный»



Образец ОАО «Барановичхлебопродукт»

Продолжение таблицы 2



Анализ последовательностей в NCBI-Blast показал, что все выделенные фрагменты принадлежат к европейскому типу, подтипу 3. Нами также был установлен процент генетического родства сикве-

нированных изолятов с первым европейским изолятом вируса PPCC virus strain Lelystad NC_043487.1 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_043487.1/. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Принадлежность образцов фрагментов ДНК из различных хозяйств Республики Беларусь по результатам сиквенс-анализа

Наименование хозяйства	Полевой штамм	Тип вируса	Процент идентичности с геномом вируса Lelystad
ЗАО «Турец»	- virus strain SU1-Bel	Genotype 1 Subtype 3	92–94 %
ОАО СГЦ «Западный»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	98,71 %
Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс»	- virus strain NL	Genotype 1 Subtype 1	90 %
ОАО «Беловежский»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89 %
ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,91 %
ЗАО «Гудевичи»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,95 %
С-к «Заря»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89,87 %
ОАО «Дрогичинский КЗ» СК «Сухое»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,79 %
КПС «Восточный»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	91,44 %
ОАО «Барановичхлебопродукт»	- virus strain SU1-Bel	Genotype 1 Subtype 3	91 %
СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89,44 %
КСУП «Дотишки»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	83,26 %
ОАО «Тарасово»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	91,81 %

Проведенный генетический анализ по участку генома, кодирующему ОРС6-7, полевых вирусов РРСС, циркулирующих в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь, показал высокое сродство с европейским типом вируса, относящимся к генотипу 1. Степень сродства с вирусом Lelystad по ОРС 6-7 составила 83–98 %. Наименьшее сродство по 7 рамке считывания обнаружено у изолята, выделенного из патологического материала, принадлежащего КСУП «Дотишки» – 83,26 %, наибольшее – у изолята, выделенного из ОАО СГЦ «Западный», – 98,71 %. Сравнительный сиквенс-анализ показал, что 13

изолятов относятся к третьему подтипу европейского типа, генетическое сродство со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain SU1-Bel partial genome sequence (GenBank: KP889243.1) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/797178073?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=JS7X1467015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/797178073?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=JS7X1467015) составляет 93–99 %, а со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/349502023?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=JS7X1467015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/349502023?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=JS7X1467015) – 95–99 % (рисунок 3).

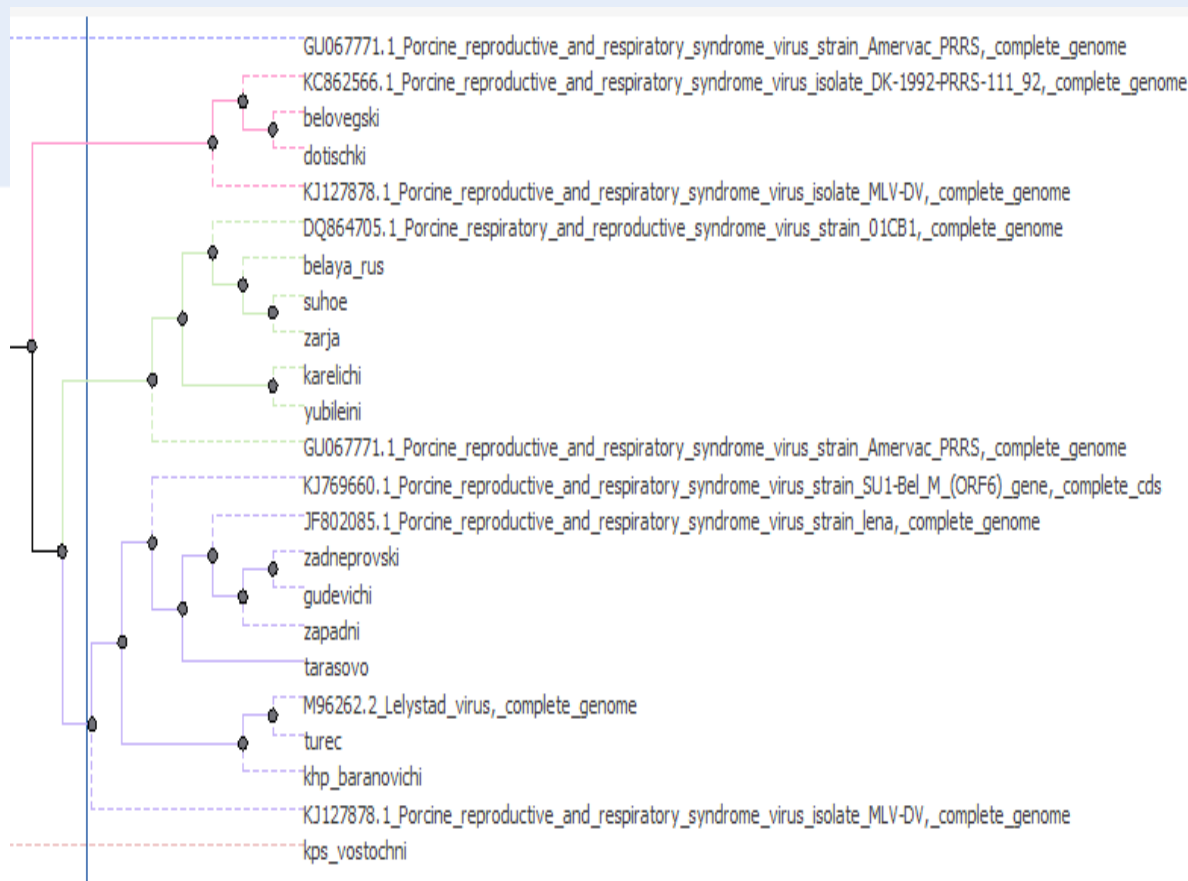


Рисунок 3. – Филогенетический анализ выделенных изолятов вируса РРСС на территории Республики Беларусь

Нами замечено, что внутри третьего подтипа наблюдался значительный полиморфизм (рисунок 3), что не противоречит результатам, полученным ранее учеными разных стран [3, 4, 5]. Так, изоляты из ОАО «Тарасово», ЗАО «Гудевичи», ОАО СГЦ «Западный» имеют более высокое сродство

со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1), тогда как изоляты ЗАО «Турец», КПС «Восточный», ОАО «Барановичхлебопродукт» имеют большее сродство с virus strain Lelystad NC_043487.1.

Нами замечено, что внутри третьего подтипа наблюдался значительный полиморфизм (рисунок 3), что не противоречит результатам, полученным ранее учеными разных стран [3, 4, 5]. Так, изоляты из ОАО «Тарасово», ЗАО «Гудевичи», ОАО СГЦ «Западный» имеют более высокое сходство со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1), тогда как изоляты ЗАО «Турец», КПС «Восточный», ОАО «Барановичхлебпродукт» имеют

большее сходство с virus strain Lelystad NC_043487.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа указывает на широкое распространение возбудителя РРСС на территории Республики Беларусь. Выделяемые изоляты обладают значительным полиморфизмом в наиболее консервативных рамках считывания (ОРС 6-7). Выделенные изоляты относятся к европейскому типу, подтип 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красникова, Е. Л. Выявление вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в биологических жидкостях организма / Е. Л. Красникова, Т. А. Савельева, А. Ю. Финогенов // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*. – 2012. – № 1. – С. 70–75.
2. Красникова, Е. Л. Специфическая профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Е. Л. Красникова, О. В. Мальчик // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2011. – № 3. – С. 40–42.
3. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes / T. Stadejek [et al.] // *J Gen Virol*. – 2006, Jul; 87 (Pt 7): 1835–41.
4. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes / P. Suarez [et al.] // *Virus Res* 42. – 1996. – P. 159–165.
5. Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Gyula Balka [et al.] // *Journal of Virological Methods Volume 158, Issues 1–2, June 2009*. – P. 41–45.

ВАКЦИНА ЖИВАЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ



- при плановой иммунизации прививаются все животные, начиная с 3-месячного возраста;
- ревакцинацию проводят через каждые 12 месяцев;
- иммунитет у животных формируется через 10–14 суток после вакцинации и сохраняется не менее 12 месяцев



www.BIEVM.BY