

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 578.82/83.083.2

Глотов А.Г.¹, Котенева С.В.¹, Глотова Т.И.¹, Южаков А.Г.², Максюттов Р.А.³,
Забережный А.Д.⁴

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕСТИВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫЯВЛЕННЫХ В СИБИРИ

¹ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск;

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Кольцово;

⁴ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Представлены результаты филогенетического анализа 3 видов пестивирусов крупного рогатого скота, циркулирующих на территории 5 регионов Сибири, а также выявленных в эмбриональной сыворотке и перевиваемых культурах клеток, который был проведен на основе 5'-нетранслируемого региона (5'-UTR). Среди высокопродуктивного молочного скота установлена циркуляция 5 субтипов вируса вирусной диарей 1-го типа (a, b, d, f, r) и вируса 2-го типа. Преобладающим субтипом являлся BVDV1b (48% положительных проб). Филогенетический анализ выявил 5 субтипов BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) и 1r (8%). Вирус 2-го типа был обнаружен в 12% проб. В перевиваемых линиях культур клеток выявили BVDV1a. Распространение типов и субтипов вирусов имело географические различия. BVDV1b, BVDV1d, BVDV1f и BVDV1r выявляли у больных или персистоно инфицированных (ПИ) животных в хозяйствах, неблагополучных по респираторным болезням. BVDV1a обнаружили в сыворотке крови ПИ нетели без проявления клинических симптомов. BVDV2 вируса выявляли у животных с патологией воспроизводства. Присутствие BVDV3 (атипичный пестивирус) итальянской группы установлено в 7 лотах эмбриональной сыворотки, полученной от двух производителей. Не найдено доказательств циркуляции атипичного вируса среди крупного рогатого скота различных пород, в том числе завезённых по импорту, маралов, северных оленей. Исследования по молекулярной эпизоотологии пестивирусов можно использовать для выбора и оптимизации стратегии контрольных мероприятий и решения вопроса о применении вакцин в конкретном регионе.

Ключевые слова: вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек; вирус 1-го типа; вирус 2-го типа (BVDV1 и BVDV2); атипичный пестивирус (BVDV3); субтиты; крупный рогатый скот; полимеразная цепная реакция; геном; 5'-нетранслируемый регион; нуклеотидный сиквенс; филогенетический анализ; молекулярная эпизоотология.

Для цитирования: Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максюттов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 185-191. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>

Glotov A.G.¹, Koteneva S.V.¹, Glotova T.I.¹, Yuzhakov A.G.², Maksyutov R.A.³, Zaberezhnyy A.D.⁴ PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE PESTIVIRUSES DETECTED IN SIBERIA

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-biotechnologies, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russian Federation;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

³State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation;

⁴All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation

The results of phylogenetic analysis of three species of bovine pestiviruses circulating in six regions of Siberia, as well as those detected in fetal embryonic serum (FBS) and continuous cell cultures, are presented. The typing was made based on comparison of sequences from the 5' untranslated region (5'-UTR) of the viral genome. Among the highly productive dairy cattle, circulation of five subtypes of the BVDV1 (a, b, d, f, r) and BVDV2 was established. The predominant subtype was 1b (48% positive samples). The number of subtypes of BVDV1 was as follows: BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) and 1r (8%) and BVDV2 (12%). Cell cultures revealed BVDV1a. The distribution of types and subtypes of viruses had geographical differences. BVDV1b, BVDV1d, BVDV1f and BVDV1r were detected in cattle or persistently infected (PI) animals in farms with respiratory distress. BVDV 1a revealed in the serum of PI heifer without manifestation of clinical symptoms. BVDV2 were detected in cattle with pathology of reproduction. The presence of the BVDV3 (atypical pestivirus) of the Italian group was established in seven lots of FBS obtained from two manufacturers. No evidence has been found for circulating of the atypical virus among cattle of various breeds, including imported, reindeers and red deers. Studies on the molecular epizootology of pestiviruses can be used to select and optimize the control strategy and address the issue of vaccine use in a particular region.

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, зав. лабораторией биотехнологии-диагностический центр СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Key words: viral diarrhea-mucosal disease; BVDV1; BVDV2; atypical pestivirus (BVDV3); subtypes; cattle; polymerase chain reaction; genome; 5'-untranslated region; nucleotide sequencing; phylogenetic analysis; molecular epizootology.

For citation: Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia. *Voprosy Virologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 185-191. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>

For correspondence: Alexander G. Glotov, Dr. Sci. Veter., professor, Head of laboratory, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-biotechnologies, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russian Federation. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about authors:

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>;

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>;

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>;

Yuzhakov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>;

Maksyutov R.A., <http://orcid.org/0000-0003-1314-281X>;

Zaberezhnyy A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 23 November 2017

Accepted 12 December 2017

Введение

Пестивирусы являются важной причиной экономического ущерба в индустрии молочного скотоводства. Болезни, вызываемые ими, распространены во всем мире с различной превалентностью, связанной с региональными особенностями стратегии ведения животноводства, в том числе в России [1–3].

Вирус вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС, BVDV) является прототипным членом рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Его геном представлен однонитевой РНК положительной полярности размером 12,3 тыс. нуклеотидов. Имеет одну открытую рамку считывания (ORF) длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), фланкированную с 5' и 3' концов нетранслируемыми областями (5'-UTR и 3'-UTR) [4].

Заболевание у крупного рогатого скота (КРС) вызывают 2 разных вида вируса – BVDV1 и BVDV2. Первый из них распространён повсеместно и в настоящее время насчитывает 21 субтип (от 1a до 1u) [5–7]. О выделении BVDV2 от КРС сообщали в США [8], Канаде [9], Бразилии [10], Уругвае [11], некоторых странах Европы: Германии [12], Словакии [13], Италии [14], Азии: Южной Кореи [15], Японии [16], Монголии [17]. Этот тип вируса подразделяется на 5 субтипов (от 2a до 2e) [18].

Для видовой дифференциации вирусов самым надёжным критерием является определение нуклеотидной последовательности геномной РНК. Чаще исследуют 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), являющийся высококонсервативной областью, подходящей для амплификации. Для филогенетического анализа дополнительно анализируют участок гена E2 (наиболее вариабельный) и участки генов E^{ns} и N^{pro} [5, 18].

Потенциальным кандидатом в члены рода является официально неклассифицированный вид вируса, имеющий в литературе несколько названий (BVDV3, NoBi-like pestivirus, атипичный пестивирус), проявляющий высокую степень сходства с BVDV1 и BVDV2. Его присутствие в популяции КРС может компрометировать программы контроля/эрадикации вирусной диареи – болезни слизистых оболочек. В настоящее время актуально изучение его распространения во всем мире через

торговлю животными, продуктами их происхождения и биологическими препаратами (сыворотка эмбрионов коров, культуры клеток, вакцины, сперма, эмбрионы для трансплантации) [19, 20]. Этот вирус впервые выделен в 2004 г. из эмбриональной сыворотки КРС, изготовленной в Бразилии [21], а позднее обнаружен у КРС в Южной Америке [22], Азии [23–25] и Европе [26, 27].

Данные о распространении и филогенетическом анализе пестивирусов КРС в России фрагментарны.

В связи с этим целью настоящей работы являлся филогенетический анализ 3 видов вирусов вирусной диареи – болезни слизистых оболочек, циркулирующих среди высокопродуктивного молочного скота в Сибири, а также присутствующих в образцах коммерческой эмбриональной сыворотки и перевиваемых линиях культур клеток.

Материал и методы

Исследования проводили в 5 регионах Западной и Восточной Сибири: Тюменской, Омской и Новосибирской областях, Красноярском и Алтайском краях, Северном Казахстане на 6 крупных молочных комплексах с поголовьем 800 и более дойных коров со среднегодовой продуктивностью 7–10 тыс. л и выше, где на момент исследований специфическая профилактика болезни не проводилась.

Пробы биоматериала брали от животных различных половозрастных категорий (ремонтные телки случного возраста, нетели, первотёлки, коровы дойные и в запусте, абортированные плоды и мертворождённые телята, телята в возрасте до 6 мес). Исследовали пробы сыворотки крови, лимфоидных органов от клинически здоровых животных (персистентная форма инфекции) и от животных с репродуктивными нарушениями и респираторным синдромом. С целью исключения острой формы инфекции индивидуальные пробы, давшие положительный результат при первом исследовании, отбирали от животных повторно через 30 дней. Диагноз на персистентную инфекцию ставили только при выявлении РНК вируса в парных пробах сыворотки крови. Пробы биоматериала, давшие положительный результат в ПЦР, хранили при -18°C до определения нуклеотидных последовательностей.

Всего исследовали 479 проб биоматериала, 18 образ-

цов эмбриональных сывороток КРС различных производителей: 12 получены из Южной Америки, 5 – из США и 1 – из Новой Зеландии, а также 9 линий перевиваемых культур клеток (MDBK, CRFK, RK13, TEB, L929, MF (Mouse Fibroblasts), KCT, BHK21, Vero).

Дополнительно к предыдущим пробам на наличие BVDV3 исследовали 140 проб внутренних органов и 630 проб сыворотки крови от КРС разных пород, в том числе поступивших по импорту, 168 проб сыворотки крови северных оленей и 63 пробы крови маралов.

Молекулярные исследования проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Выделение тотальной РНК вируса осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Реакцию обратной транскрипции для получения кДНК выполняли с использованием коммерческого набора «РЕВЕРТА-Л» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Для выявления атипичного вируса ВД-БС КРС 1-го и 2-го типов в пробах биоматериала использовали панпраймеры согласно данным в работе [28], фланкирующие регион 5'-UTR с последующим секвенированием для определения принадлежности к типу/субтипу:

5' cat gcc cat agt agg ac 3',
5' cca tgt gcc atg tac ag 3'.

Для выявления атипичного вируса использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры собственного дизайна, комплементарные позициям 9202 – 9218 и 9501 – 9521 генома штамма D32/00_НоВи атипичного пестируса КРС (AB871953.1):

SEQ ID NO:1 – 5' ttgacgcccagcgtag 3',
SEQ ID NO:2 – 5' cctcctgcatctgtcacctt 3'.

Состав реакционной смеси включал следующие компоненты: ПЦР-буфер (60 мМ трис-НСl (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,2 мМ dNTP, по 0,1 мкг каждого праймера, 1,25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК. Температурный режим проведения ПЦР: 95°C – 5 мин – 1 цикл; 95°C – 45 с, 55°C – 45 с, 72°C – 1 мин – 35 циклов; 72°C – 5 мин – 1 цикл.

Определение размера продуктов ПЦР. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере (рН 8,0) по общепринятой методике [28]. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результат ПЦР с общими праймерами для выявления вирусов 2 типов считали положительным при соответствии длины продукта ПЦР размеру фрагмента 289 пар нуклеотидов (п. н.) и 320 п. н. для атипичного вируса.

Получение положительных контрольных образцов (ПКО) для BVDV3. Методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки вируса длиной 320 п. н., для контроля амплификации получали ПКО. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS («Invitrogen», США) и флуориметра QUBIT («Invitrogen», США). Она составила 0,333 мкг/мкл, что в пересчете на количество копий соответство-

вало $7,4 \cdot 10^{10}$ копий/мкл. Синтезированные ПКО использовали в качестве контроля ПЦР в связи с отсутствием РНК нативного вируса. Для определения чувствительности реакции готовили 10-кратные разведения ПКО, и каждое разведение подвергали исследованию в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора BigDye 3.1 («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы производителя. Реакцию проводили в программируемом термостате GeneAmp PCR-system 6700 с использованием следующей программы:

Номер цикла	Температура, °C	Время
1-30	96	10 с
	50	15 с
	60	4 мин

После амплификации реакционную смесь очищали от невключившихся флуоресцентно меченных нуклеотидов очисткой на сефадексе G-50 superfine. Нуклеотидные последовательности определяли по обеим цепям ДНК. Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм) проводили с помощью программы Sequencer 4.0.5. («Gene Codes», США).

Анализ последовательностей. Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых фрагментов проводили методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов BVDV1, BVDV2 и BVDV3 с помощью программы BioEdit 7.0.0. Построение дендрограмм проводили при помощи метода наибольшего правдоподобия (ML – maximum likelihood) в программе MEGA v.7 [30]. Для оценки достоверности топологии использовали бутстрэп-тест (1000 репликаций) [31].

Результаты

BVDV1 и BVDV2. По результатам ПЦР 46 проб биоматериала от животных содержали геном пестивирусов, что составило 9,1%, из которых первичные нуклеотидные последовательности удалось определить только для 25 (5,2%) проб.

Количество положительных проб по регионам составило: Тюменская область – 15, Новосибирская область – 6, Омская область – 1, Красноярский край – 2, Северный Казахстан – 1. Всего 25 проб.

В результате среди высокопродуктивного молочного скота установлена циркуляция 5 субтипов вируса вирусной диареи 1-го типа (a, b, d, f, r) и вируса 2-го типа. Преобладающим субтипом являлся BVDV1b (48% положительных проб). Филогенетический анализ выявил 5 субтипов BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) и 1r (8%). Вирус 2-го типа был обнаружен в 12% проб.

Распространение субтипов имело некоторые географические различия. Вирус субтипа 1a выявили только в Тюменской области во внутренних органах абортрованного плода и сыворотке крови телёнка австрийского и голландского происхождения соответственно.

Вирус субтипа 1b выявляли также у животных в Тюменской области, завезённых из Голландии, США, Словении, Германии и Дании с ПИ животными. Две пробы, принадлежащие к этому субтипу, были выявлены в Новосибирской области в сыворотках крови коровы мест-

ной породы и нетели из Германии. В одном случае вирус этого субтипа обнаружили в пробе сыворотки коровы из Красноярского края.

Субтип 1f был обнаружен в Северном Казахстане в пробе сыворотки крови телёнка с респираторной патологией, рождённого нетелью, завезённой из Германии. Также его выявили в сыворотках крови ПИ животных Тюменской, Омской областей и во внутренних органах телёнка с пневмонией в Красноярском крае. Вирус субтипа 1d обнаружили в одном из хозяйств Тюменской (страна-импортёр – Франция) и Новосибирской области (местный скот). Субтип 1g выявили в крови телёнка с респираторной патологией в Тюменской области и селезёнке телёнка местной породы в неблагополучном по респираторным болезням хозяйстве Новосибирской области.

В данной работе нам не удалось определить субтип BVDV2, однако его присутствие было установлено в 12% проб, отобранных от животных с патологией органов воспроизводства, в 2 случаях от животных в Новосибирской области в 2006 и 2010 гг. (абортплоды, местный скот) и в 2013 г. в тканях мертворождённого телёнка от нетели, завезённой в Тюменскую область из США. Хозяйства, в которых был обнаружен этот тип вируса, находились на расстоянии не менее 1000 км друг от друга и не имели связей между собой, что исключает обмен вирусами. Исходя из этого можно предположить, что данный тип вируса существовал у животных отечественных пород задолго до ввоза импортированных и играет определённую роль в возникновении патологии воспроизводства у КРС. Эпизоотологические данные свидетельствуют о низкой вирулентности отечественного вируса, так как показатели заболеваемости и летальности животных были ниже, чем в хозяйстве Тюменской области.

Выявленное в данной работе генетическое разнообразие вирусов предполагает существование различных источников возбудителя, включая импортных высокопродуктивных животных, создаёт риск неконтролируемого его распространения в регионе.

Во всех проверенных нами перевиваемых линиях культур клеток присутствовал в качестве контаминанта BVDV1a. В настоящее время причину такой контаминации установить сложно, так как в процессе культивирования этих линий с 1994 г. использовались различные сыворотки различных производителей. В двух из них выявили геном BVDV1j. Возможно, занос вируса был одномоментным при использовании этих партий сыворотки.

Филогенетическое дерево, построенное на основании сиквенса 5'-UTR региона вируса, приведено на рис 1.

BVDV3. Геном вируса выявили только в 7 из 18 образцов эмбриональных сывороток двух производителей, имеющих в нашем распоряжении. Результаты филогенетического анализа показали, что все 7 проанализированных нуклеотидных последовательностей наиболее близки к штаммам BVDV3, ранее выделенным в Италии. Результаты представлены на рис. 2. Геном вируса присутствовал в 2 лотах (сериях) сыворотки российского производства (расфасовки) (ООО «Биолот») и 5 сериях PAA Laboratories. Следует отметить, что случайно отобранные эмбриональные сыворотки, содержащие атипичный вирус, использовались для культивирования перевиваемых линий культур клеток в 4 российских НИИ ветеринарного и медицинского профиля начиная с

90-х годов прошлого столетия. Результаты исследования проб сыворотки крови и биоматериала от животных в ПЦР на атипичный пестивирус были отрицательными.

Обсуждение

Известно, что пестивирусы благодаря строению своего генома обладают большой мутацонной активностью, выражающейся в постоянно увеличивающемся генотипическом и фенотипическом многообразии штаммов, роль которых в патологии животных до конца не изучена. Существование полиморфизма вирусов затрудняет диагностику болезней и может снижать эффективность вакцинации и контрольных программ, основанных на применении специфической профилактики болезни.

Так, S. Silveira и соавт. [10] в результате филогенетического анализа 81 изолята пестивирусов, полученных от животных крупных молочных ферм, а также из образцов эмбриональной сыворотки, культур клеток, 53,9% отнесли к BVDV1, 33,7% – к BVDV2 и 12,4% – к BVDV3. Распределение субтипов было следующим: BVDV1a – 35,9%, BVDV2b – 31,4%, BVDV1b – 10,1%, BVDV1d – 6,7%, BVDV2c – 2,2% и BVDV1e – 1,1%. BVDV2c и BVDV1e были выявлены впервые в этой стране. Результаты работы подтвердили существование генетической гетерогенности вирусов. Авторы считают, что полученная информация может служить основой для разработки и оценки диагностических тестов, более эффективных вакцин и программ контроля.

Китайскими исследователями M. Deng и соавт. [7] на основании филогенетического анализа гена 5'-UTR 124 проб выявлено преобладание BVDV1 и его субтипов: BVDV1b (33,06%), BVDV1m (49,19%) и нового кластера, обозначенного как BVDV1u (17,74%).

Нами на основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири установлена циркуляция BVDV2 и 5 субтипов BVDV1 (1a, 1b, 1d, 1f, 1r). Дополнительно в эмбриональной сыворотке и культурах клеток обнаружен BVDV1a. В 7 партиях сыворотки, использованной нами для культивирования в 2001–2012 гг., выявили BVDV3, наиболее близкий к атипичным пестивирусам, выделенным в Италии.

В данной работе для секвенирования мы использовали высококонсервативный регион пестивирусов 5'-UTR, что является общепринятым. Использование этого региона даёт наиболее точные результаты, особенно в отношении распределения изолятов вирусов по видам или типам (генотипам), поэтому он является областью, из последовательностей которой наиболее часто выбираются праймеры [5, 28].

В зарубежной литературе есть сообщения о выявлении генома пестивирусов в эмбриональной сыворотке. Например, M. Giammaglioli и соавт. [27] в результате исследования методом ПЦР 26 архивных партий препарата, полученных в 1992–2013 гг., прошедших процесс фильтрования и гамма-облучения, выявили как минимум по одному пестивирусу КРС в каждой из них. Двадцать серий были положительны на BVDV1, 10 – на BVDV2, а 15 содержали NoBi-like вирус. Семь партий были произведены в Южной Америке и одна – в Австралии. Страна происхождения для оставшихся 7 серий не была определена. Филогенетический анализ показал, что обнаруженный вирус относится к бразильской группе вирусов и был занесен в Италию с эмбриональной сывороткой.

По данным F.V. Bauermann и соавт. [32], исследовав-

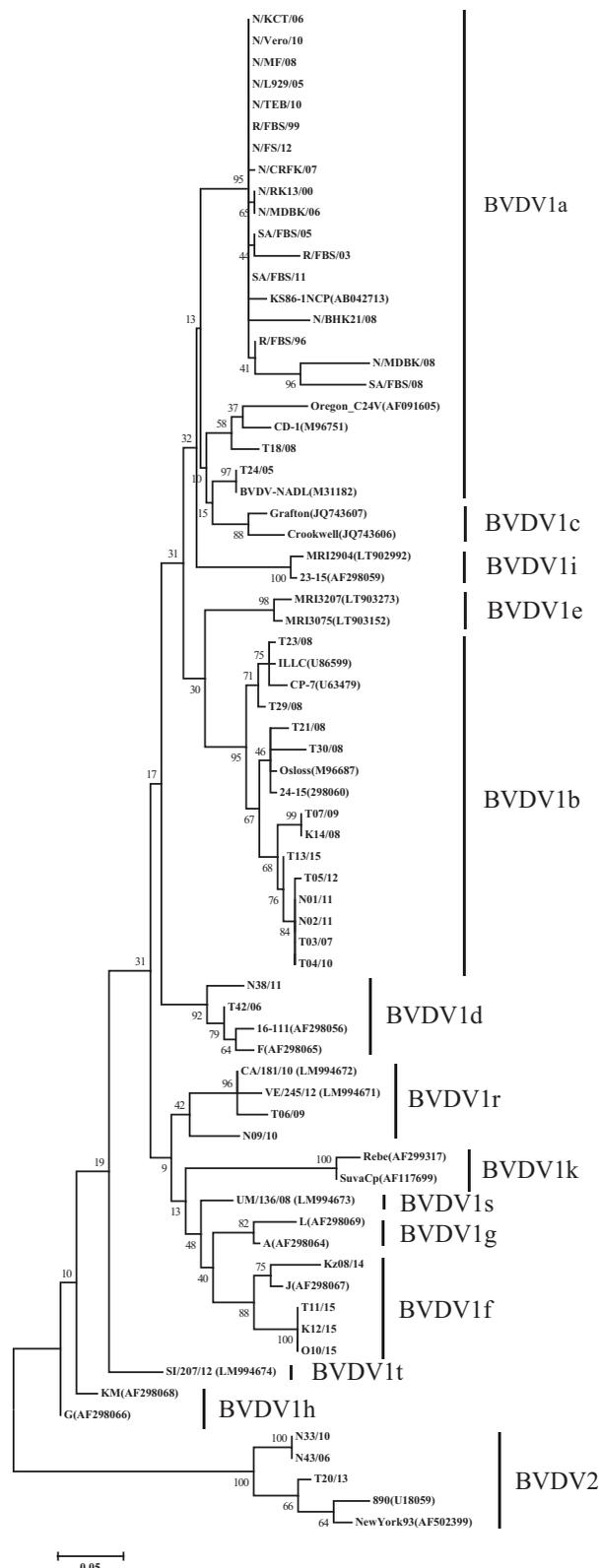


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка 5' нетранслируемой области генома вируса диареи КРС. Здесь и на рис. 2: выравнивание последовательностей провели с использованием ClustalW-метода. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Для референсных штаммов указано название и номер в базе данных GenBank.

ших 90 серий коммерческой сыворотки, произведённой в США, но расфасованной в Европе, вирус обнаружен не был, что дало основание авторам сделать заключение об отсутствии циркуляции вируса в этой стране. Однако часть лотов содержала BVDV. Филогенетический анализ 20 положительных серий показал, что в 19 из них присутствовал BVDV1, а в одной – BVDV2.

Этот факт свидетельствует о возможной контаминации эмбриональных сывороток, маркированных как «произведено в США», в процессе изготовления и упаковки, неправильной маркировки после обработки и смешивания в других географических регионах мира. Это может настораживать, так как на рынке этого препарата чаще всего присутствуют партии, маркированные как «сделано» в США или Австралии, но, по официальным данным, эти страны свободны от атипичного вируса КРС.

Ранее нами была установлена циркуляция BVDV1b, BVDV1d и BVDV2 среди местного скота. В настоящей работе вновь найдено подтверждение циркуляции этих типов вирусов среди местного и импортного КРС [33].

В нашей стране исследования по изучению контаминации культур клеток вирусом вирусной диареи проводили Л.В. Урываев и соавт. [34, 35], которые анализировали частоту контаминации 127 клеточных линий и эмбриональных сывороток телят (ЭТС), используемых в биологических и вирусологических исследованиях, нецитопатогенным BVDV. С использованием моноклональных антител к гликопротеину оболочки вириона вирус выявили в 33% образцов клеток (из 131 клеточной линии и отливок) и более чем в 60% случаев — в ЭТС (из 37 проверенных партий). Установили способность вируса инфицировать широкий спектр культур разной видовой, тканевой и органной специфичности культур и сывороток для их роста (MDBK, ПЭК, Vero, MDCK и др.).

С.В. Алексеев и соавт. [36] установили, что культуры клеток бычьего и свиного происхождения подвержены контаминации вирусом диареи КРС. Результаты филогенетического анализа штаммов MDBK/12, SPEV/12 и KST/12, обнаруженных в одноимённых клеточных культурах, показали их значительное сходство между собой и с эпизоотическим штаммом 190NCP нецитопатогенного биотипа, обнаруженным в Японии в 1987 г. во время вспышки геморрагического гастроэнтерита (сходство первичной структуры генома свыше 98%). Источником вируса, вероятно, послужила сыворотка КРС, используемая в составе среды для роста клеток.

С.В. Вангели и соавт. [37] выявили смешанную хроническую инфекцию перевиваемых культур клеток, используемых при производстве антигена для серологической диагностики лейкоза КРС.

В отношении BVDV3 в доступной отечественной литературе нам удалось найти сообщение об обнаружении атипичного пестивируса в составе коммерческой вакцины против чумы мелких жвачных животных на территории Республики Таджикистан [38].

Распространение этого вируса в отличие от вируса ВД-БС КРС, возможно, ограничено несколькими регионами. Впервые NoBi-like вирус был выделен из партии эмбриональной сыворотки, собранной в Бразилии, но расфасованной в Европе, и охарактеризован в Германии Н. Schirgmeier и соавт. [21]. Изолят, названный D32/00_NoBi, был признан прототипным для бразильской группы вирусов. После этого несколькими авторами были

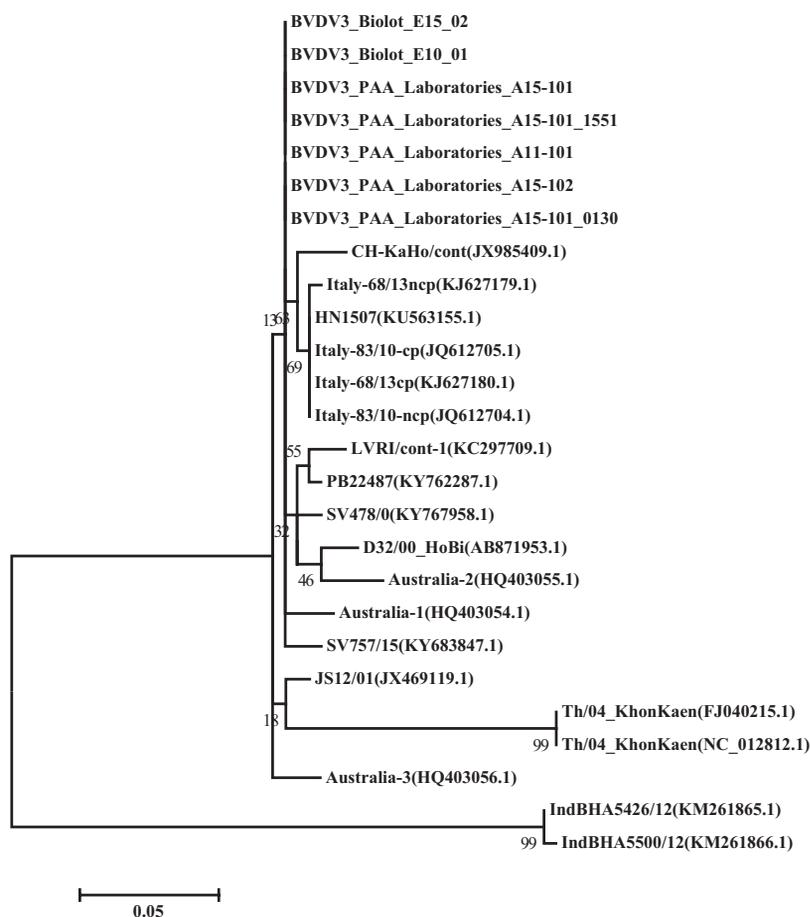


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка гена N^{pro} генома вируса диареи КРС 3-го типа.

идентифицированы генетически различающиеся под-типы, имеющие региональное распространение, в частности тайский [32]. Затем N. Mishra и соавт. [25] предположили существование третьей, индийской, группы штаммов. Недавно идентифицирована четвертая группа вирусов, выделенных за пределами Индийского региона, в частности в Италии [27]. Таким образом, к настоящему времени установлено наличие 4 генетических групп данного вируса.

В настоящей работе нами подтверждено присутствие BVDV3 итальянской группы в исследованных образцах коммерческих лотов эмбриональной сыворотки, которая используется на территории России.

Заключение

Если учесть, что в России меняется стратегия ведения животноводства, возрастает количество молочных «мега-ферм», изучение генетического разнообразия пестивирусов является актуальным. В данной ситуации необходимо проводить исследование молекулярной эпизоотологии пестивирусов, циркулирующих среди КРС на молочных комплексах, особенно с наличием животных, завезённых из разных стран. Сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании

новых и высоковирулентных штаммов вирусов. Нами на основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири установлена циркуляция BVDV2 и 5 субтипов BVDV1 (1a, 1b, 1d, 1f и 1r). Преобладающим субтипом является BVDV1b. Распространение типов и субтипов вирусов имеет географические различия. В связи с этим исследования молекулярной эпизоотологии пестивирусов КРС в конкретном регионе можно выполнять с целью оптимизации и выбора стратегии контрольных мероприятий на региональном уровне и решать вопросы о применении вакцин. Это особенно важно при реализации программ вакцинации животных, когда генетические типы вакцинных штаммов не совпадают с типами, циркулирующими среди животных на конкретной территории. Полученная в ходе таких исследований информация может быть полезной при изучении молекулярной эпизоотологии вирусов, разработке эффективных вакцин и программ контроля инфекции.

Выявление BVDV3 в пробах эмбриональной сыворотки создает риск контаминации биологических препаратов и распространения его на территории России.

Полученные данные подтверждают необходимость постоянного обновления и совершенствования методов диагностики пестивирусов КРС, а также соблюдения правил международной торговли эмбриональной сывороткой и животными.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-19, 21-32 с.м. REFERENCES)

- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-1.
- Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13-8.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(4): 399-8.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(6): 43-7.
- Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Парасюк Н.А., Селиванова Т.К. и др. О контаминации клеточных культур вирусом диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV). *Бюллетень экспериментальной биологии медицины*. 2012; 153(1): 88-3.
- Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А. и др. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии*. 2012; 5(57): 15-21.
- Алексеев С.В., Юров Г.К., Гальбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом

диареи крупного рогатого скота — необходимое условие производства биологических препаратов. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013; (1): 15-8.

37. Вангели С.В., Надточей Г.А., Гальнбек Т.В. Смешанные инфекции РНК-содержащих вирусов, в перевиваемых культурах клеток. *Инфекционные болезни*. 2016; 51(14): 57.
38. Юров К.П., Аноятбекова А.М., Алексеенкова С.В. Новый пестивирус-Хоби вирус-контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных. *Ветеринария*. 2016; (10): 8-10.

REFERENCES

1. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105-1.
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. Distribution of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-1. (in Russian)
3. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhoea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13-8. (in Russian)
4. Simmonds P., Becher P., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., et al. Family Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science; 2011: 1003-20.
5. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Paton D.J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72(1-2): 31-5.
6. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Perez Aguirreburualde M.S., Combessies G., Odeón A.C., et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96(1): 204-2.
7. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y., et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134777.
8. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129-9.
9. Carman S., Van Dremel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10(1): 27-5.
10. Silveira S., Weber M.N., Mósena A.C., da Silva M.S., Streck A.F., Pescado C.A., et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(2): 613-23.
11. Maya L., Puentes R., Reolón E., Acun P., Riet F., Rivero R., et al. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 2016; 161(3): 529-5.
12. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 2001; 76(1): 31-2.
13. Nováčková M., Jacková A., Kolesárová M., Vilcek S. Genetic analysis of a bovine viral diarrhoea virus 2 isolate from Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52(3): 161-6.
14. Luzzago C., Lauzi S., Ebranati E., Giammarioli M., Moreno A., Cannella V., et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 147145.
15. Oem J.K., Hyun B.H., Cha S.H., Lee K.K., Kim S.E., Kim H.R., et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2009; 139(3-4): 356-60.
16. Yamamoto T., Kozasa T., Aoki H., Sekiguchi H., Morino S., Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet. Microbiol.* 2008; 127(3-4): 386-1.
17. Ochirkhuu N., Konnai S., Odbileg R., Odzaya B., Gansukh S., Murata S., et al. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.* 2016; 161(8): 2279-83.
18. Giangaspero M., Harasawa R. Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type 1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*. 2014; 195: 34-53.
19. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2013; 25(1): 6-15.
20. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical pestiviruses of cattle. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2015; 50(4): 399-8. (in Russian)
21. Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 12): 3647-2.
22. Weber M.N., Mósena A.C.S., Simoes S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C. R. M., Budaszewski R.F., et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with "HoBi"-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(1): 92-100.
23. Mao L., Li W., Zhang W., Yang L., Jiang J. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *J. Virol.* 2012; 86(22): 12444.
24. Haider N., Rahman M.S., Khan S.U., Mikolon A., Gurley E.S., Osman M.G., et al. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(3): 193-8.
25. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014; 174: 239-6.
26. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(8): 1549-2.
27. Giammarioli M., Ridpath J.F., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., De Mia G.M., et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*. 2015; 43(4): 220-4.
28. Ridpath J.F., Bolin S.R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes*. 1998; 12(2): 101-6.
29. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 1994; 22(22): 4673-80.
30. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4.
31. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 1985; 125(1): 1-15.
32. Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R., Ridpath J. F. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26(1): 10-7.
33. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Zaberezhnyy A.D., Aliper T.I. Isolation of noncytopathogenic genotype 2 bovine viral diarrhoea virus from the cattle mucosa in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(6): 43-7. (in Russian)
34. Uryvaev L.V., Dedova A.V., Dedova L.V., Ionova K.S., Parasyuk N.A., Selivanova T.K., et al. On the contamination of cell cultures by the virus of diarrhoea-disease of mucous membranes of large cattle (BVDV). *Byulleten' eksperimental'noy biologii meditsiny*. 2012; 153(1): 88-3. (in Russian)
35. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., et al. Analysis of contamination of cell cultures with Pevidovirus BVDV and mycoplasmas. *Voprosy virusologii*. 2012; 5(57): 15-21. (in Russian)
36. Alekseenkova C.V., Yurov G.K., Gal'nbek T.V., Kalita I.A., Yurov K.P. Checking of cell cultures for contamination with a bovine diarrhoea virus is a necessary condition for the production of biological preparations. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnye*. 2013; (1): 15-8. (in Russian)
37. Vangeli S.V., Nadtochey G.A., Gal'nbek T.V. Mixed infections of RNA-containing viruses, in transplantable cell cultures. *Infektsionnye bolezni*. 2016; 51(14): 57. (in Russian)
38. Yurov K.P., Anoyatbekova A.M., Alekseenkova S.V. The new pestivirus - Hobi virus - is a contaminant vaccine against the plague of small ruminant animals. *Veterinariya*. 2016; (10): 8-10. (in Russian)

Поступила 23.11.17

Принята в печать 12.12.17