

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИЗООТОЛОГИЯ ЯЩУРА В РОССИИ (ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА)

А.В. Щербakov
заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье обобщены результаты 20-летних молекулярно-эпизоотологических исследований ящура в России. Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура доказывает, что все вспышки ящура в Российской Федерации в 1995–2014 гг. были вызваны заносом болезни из других стран, главным образом из Китая. Показано, что в разные годы происходил занос в Россию разных генетических линий/штаммов вируса ящура: 1995 г. — O/CATHAY, 2000 и 2004 гг. — O/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 гг. — Asia1, 2010–2011 гг. — O/SEA/Mea-98, 2012 г. — O/ME-SA/PanAsia, 2013 г. — A/ASIA/Iran-05 и A/ASIA/Sea-97, 2014 г. — A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/PanAsia и O/SEA/Mea-98. Большинство вспышек, зарегистрированных в Забайкалье и на Дальнем Востоке Российской Федерации, представляли собой продолжение панзоотий ящура, имеющих один и тот же путь распространения: из стран Юго-Восточной Азии в Китай и далее в Россию.

Ключевые слова: вирус ящура, филогенетический анализ.

FMD MOLECULAR EPIZOOTOLOGY IN RUSSIA (PHYLOGENETIC ANALYSIS OF RUSSIAN FMDV ISOLATES)

A.V. Scherbakov
Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

SUMMARY

The paper sums up the results of 20-year-long FMD molecular and epizootological studies in Russia. Phylogenetic analyses of the Russian FMDV isolates are indicative of the fact that all FMD outbreaks in the Russian Federation in 1995–2014 were due to the virus introduction from other countries, mainly from China. It was demonstrated that in different years FMDV of different genetic lineages/ strains was introduced into Russia, i.e. 1995 – O/CATHAY, 2000 and 2004 – O/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 – Asia1, 2010–2011 – O/SEA/Mea-98, 2012 – O/ME-SA/PanAsia, 2013 – A/ASIA/Iran-05 and A/ASIA/Sea-97, 2014 – A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/PanAsia and O/SEA/Mea-98. The majority of the outbreaks reported in the Zabaikalsky Krai and Far East of the Russian Federation were associated with FMD panzootics having the same route of spread: from Southeast Asian countries to China and hereafter to Russia.

Key words: foot and mouth disease virus (FMDV), phylogenetic analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур — высококонтагиозная вирусная болезнь домашних и диких парнокопытных животных. Относится к категории трансграничных болезней, способных преодолевать границы между государствами, вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса ящура (ВЯ): О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2 и SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов.

В настоящее время в мире существует семь экосистем (пулов) ВЯ: 1 — Юго-Восточная Азия и Китай, 2 — Южная Азия, 3 — Ближний и Средний Восток, 4 — Западная и Центральная Африка, 5 — Восточная Африка, 6 — Южная Африка и 7 — Южная Америка [18]. В каждом пуле циркулируют штаммы ВЯ, отличающиеся по генетическим и антигенным свойствам. Эти устойчивые генетические группы получили название топотипов (географических типов) [13, 17]. В пределах каждого топотипа различают многочисленные генетические линии ВЯ.

В России ящур не эндемичен, однако существует постоянная угроза заноса этой болезни из соседних азиатских стран. Вспышки ящура, вызванные заносом инфекции извне, регистрировались в современной России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2014 гг. [1, 2, 4, 5, 19, 20].

Для определения происхождения вирусов, ответственных за вспышки ящура, используется технология, предполагающая секвенирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP1. Впервые данный подход в исследованиях ящура применили в 1987 г. E. Beck и K. Strohmaier [9]. В РФ филогенетический анализ применяется в эпизоотологических исследованиях ящура с начала 90-х гг. прошлого века [14]. Филогенетические исследования позволяют не только устанавливать происхождение ВЯ, вызвавшего вспышку болезни, но и отслеживать пути распространения эпизоотий, а также изучать процесс эволюции и смены штаммов/генетических линий в регионах, где вирус ящура эндемичен.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы обобщить результаты многолетних молекулярно-эпизоотологических исследований ящура в России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Патологический материал. Для исследований использовали пораженный ящуром эпителий от крупного и мелкого рогатого скота и свиней. Патматериал поступил в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 1995–2014 гг. из различных регионов РФ.

Выделение РНК. РНК выделяли из 10%-й суспензии эпителия методом аффинной сорбции на стекловолокнистых фильтрах, как описано ранее [7].

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Амплификацию гена VP1 проводили методом ОТ-ПЦР в соответствии с «Методическими указаниями по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1» [3].

Секвенирование. В 1995–2006 гг. секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора fmoI DNA Cycle Sequencing System (Promega, США) в со-

ответствии с рекомендациями фирмы-производителя. В качестве метки применяли [α - 32 P]-дезоксиаденозин-5'-трифосфат производства фирмы «Изотоп» (г. Обнинск). С 2007 г. секвенирование осуществляли с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit и автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ BioEdit. Для графического построения дендрограмм применяли программу MEGA 6, Neighbor-Joining method, 1000 bootstrap replications.

РЕЗУЛЬТАТЫ

За последние 20 лет вспышки ящура регистрировались в России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2014 гг. Задача исследований состояла в том, чтобы определить происхождение эпизоотических изолятов ВЯ, вызвавших эти вспышки.

В 1995 г. ящур типа О был зарегистрирован у свиней в хозяйстве «Петровское» Люберецкого района Московской области. Филогенетический анализ показал, что вирус, вызвавший эту вспышку, принадлежит к топотипу Cathay (Китай) (рис. 1). Этот топотип эндемичен в КНР и имеет уникальную биологическую особенность: в отличие от всех других топотипов ВЯ он поражает только свиней и не способен вызывать клиническое заболевание у крупного и мелкого рогатого скота [8]. Полученная в результате филогенетического анализа информация о китайском происхождении подмосковного изолята позволила оперативно установить источник инфекции: им оказалась свинина, которую импортировал из КНР подмосковный мясокомбинат, расположенный в непосредственной близости от хозяйства «Петровское».

В 2000 г. вспышка ящура типа О была зарегистрирована в Приморском крае РФ. Филогенетические исследования показали, что вирус, ответственный за эту вспышку, принадлежит к генетической линии PanAsia (ПанАзия). Эта генетическая линия впервые была зарегистрирована в Индии в 1990 г. В 1998 г. вирус вышел за пределы этой страны, и его распространение приобрело характер панзоотии. К 2000 г. паназиатский штамм вызвал вспышки ящура практически во всех азиатских странах, в том числе в Монголии, Южной Корее и Японии, где болезнь регистрировалась до этого в 1973, 1934 и 1908 гг. соответственно [11]. В связи с тем, что панзоотия, обусловленная этим вирусом, охватила весь Азиатский континент, штамм и получил название «ПанАзия». В 2001 г. паназиатский штамм был занесен в Западную Европу и вызвал опустошительную эпизоотию в Великобритании. В Приморском крае РФ до 2000 г. ящур регистрировался последний раз в 1964 г. Из всех изолятов вируса ящура, чьи нуклеотидные последовательности представлены в международной базе данных GenBank, генетически наиболее близким приморскому изоляту 2000 г. является китайский изолят O/CHN/2/99 (AJ318831). Это подтверждает, что ящур в Россию был занесен с территории КНР. Таким образом, вспышку ящура в России в 2000 г. можно рассматривать как составную часть панзоотии, обусловленной паназиатским штаммом ВЯ и охватившей весь Азиатский континент.

Вспышка ящура в Амурской области в 2004 г. также была вызвана паназиатским штаммом ВЯ типа О. Поиск ближайших родственников в GenBank показал, что

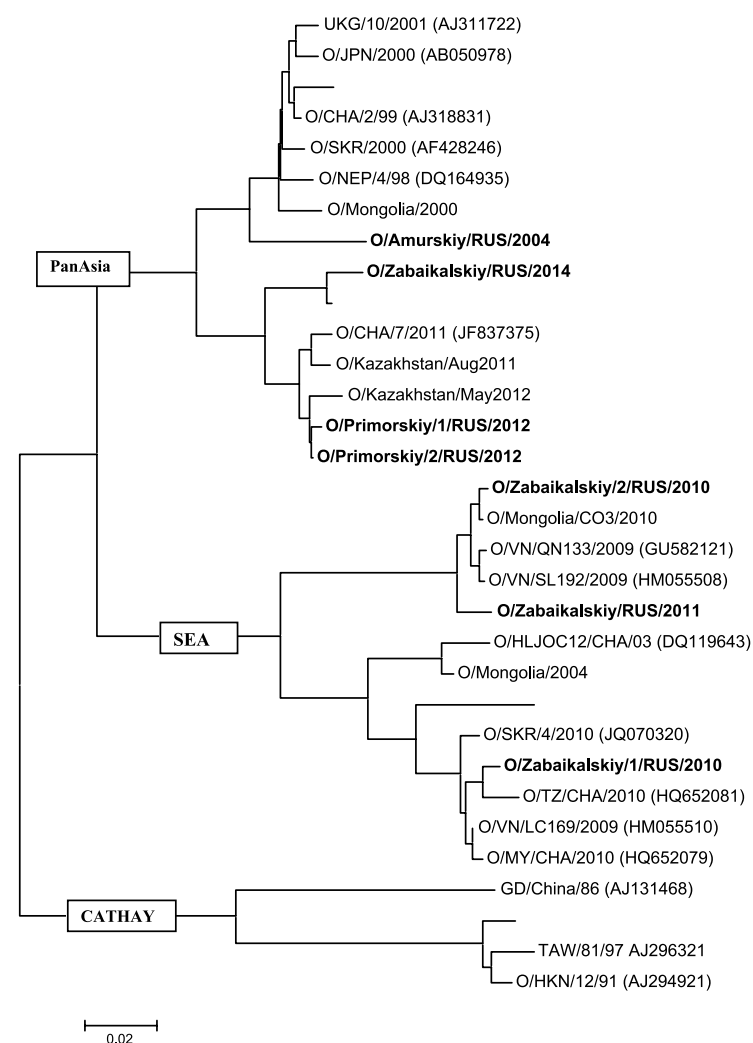


Рис. 1. Положение российских изолятов на филогенетическом древе ВЯ типа О. Дендрограмма основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP1

амурский изолят имеет максимальный уровень идентичности (96%) с изолятами O/CHA/2/99, Tibet/CHA/99 и SAR/1/2000. Учитывая географию вспышки, можно предполагать, что и в этом случае ящур на территорию РФ был занесен из Китая.

В 2005 г. вспышки ящура были зарегистрированы в Амурской области (1 очаг), Хабаровском крае (4 очага) и Приморском крае (9 очагов) РФ [6]. Все они были вызваны экзотическим для России серотипом Азия-1 ВЯ. Филогенетический анализ показал, что все российские изоляты генетически очень близки вирусу, вызвавшему в 2005–2006 гг. масштабную эпизоотию ящура этого типа в Китае (рис. 2) [16]. Это доказывает, что вспышки ящура типа Азия-1 в РФ в 2005 г. были вызваны заносом болезни с территории КНР.

В 2006 г. в России были зарегистрированы еще две вспышки ящура типа Азия-1: по одному очагу в Читинской и Амурской областях. Населенные пункты были расположены вблизи российско-китайской границы. Очевидно, что и в этих случаях имел место занос болезни из Китая.

В 2007–2009 гг. в РФ наблюдался короткий период благополучия по ящуре, а в 2010 г. вспышки ящура

типа О были зарегистрированы в двух населенных пунктах Забайкальского края: с. Абагайтуй Забайкальского района и с. Макарово Шилкинского района. Филогенетический анализ изолятов, ответственных за эти вспышки, показал, что они относятся к генетической линии Муа-98 (Мьянма-98) топотида SEA (Юго-Восточная Азия) серотипа О [10], но к разным сублиниям (рис. 1).

Изолят из с. Абагайтуй (на рис. 1 он обозначен как O/Zabaikalskiy/1/RUS/2010) имел очень близкое генетическое родство с вирусом, вызвавшим в 2009 г. многочисленные вспышки ящура во Вьетнаме, а в 2010 г. — в Китае, Южной Корее и Японии. Таким образом, можно утверждать, что вспышка в с. Абагайтуй Забайкальского края эпизоотически связана с панзоотией ящура, начавшейся в Юго-Восточной Азии и охватившей затем страны Восточной Азии.

Необходимо отметить, что панзоотия 2010 г. является не первым случаем выхода ВЯ O/SEA/Муа-98 за пределы своего естественного ареала — Юго-Восточной Азии. В 2003 г. эта генетическая линия уже регистрировалась в КНР, откуда затем попала в Монголию (изоляты O/HLJOC12/CHA/03 и O/Mongolia/2004 на рис. 1). Однако масштабы эпизоотических процессов 2003–2004 и 2010 гг. были несравнимыми.

Неожиданные результаты были получены при изучении вируса, вызвавшего вспышку ящура в с. Макарово Забайкальского края. Этот населенный пункт примерно равноудален от границы с Монголией и КНР. Изолят из с. Макарово (на рис. 1 он обозначен как O/Zabaikalskiy/2/RUS/2010) также принадлежал к топотипу Юго-Восточная Азия, однако к другой сублинии, нежели корейские, японские, китайские изоляты 2010 г. и вирус из с. Абагайтуй. Вирус, вызвавший вспышку в с. Макарово, имел максимальное генетическое родство с изолятами из Таиланда, Вьетнама и Монголии. В Монголии первые вспышки ящура типа О были зарегистрированы в мае, а вспышка в с. Макарово — в августе 2010 г. Таким образом, можно было бы предположить, что в с. Макарово ящур был занесен с территории Монголии. Однако остается неясным, откуда эта сублиния ВЯ попала в Монголию. Занос непосредственно из стран Юго-Восточной Азии маловероятен, но возможен. Тем не менее нельзя исключать и другой возможности. Китай традиционно сообщает далеко не обо всех вспышках ящура на своей территории. Возможно, что в 2010 г. на территорию КНР из Юго-Восточной Азии была занесена не одна, а две сублинии ВЯ O/SEA/Муа-98, а Китай уведомил только о тех вспышках, которые были вызваны одной из них. В этом случае вспышки ящура в Монголии и с. Макарово Забайкальского края РФ могли быть обусловлены заносом инфекции из КНР. В любом случае полученные результаты доказывают, что две вспышки ящура в Забайкальском крае РФ в 2010 г. не связаны между собой эпизоотически и вызваны независимым заносом извне двух разных сублиний ВЯ O/SEA/Муа-98.

Еще одна вспышка ящура типа О была зарегистрирована в Забайкальском крае РФ (с. Усть-Ималка, Ононский район) в марте 2011 г. Филогенетический анализ показал, что вирус, ответственный за эту вспышку, по первичной структуре гена VP1 идентичен изолятам O/Макарово/РФ/2010 и O/Монголия/CO3/2010 на 98,51 и 98,75% соответственно (рис. 1). Уверенно определить источник болезни в этом случае трудно, одна-

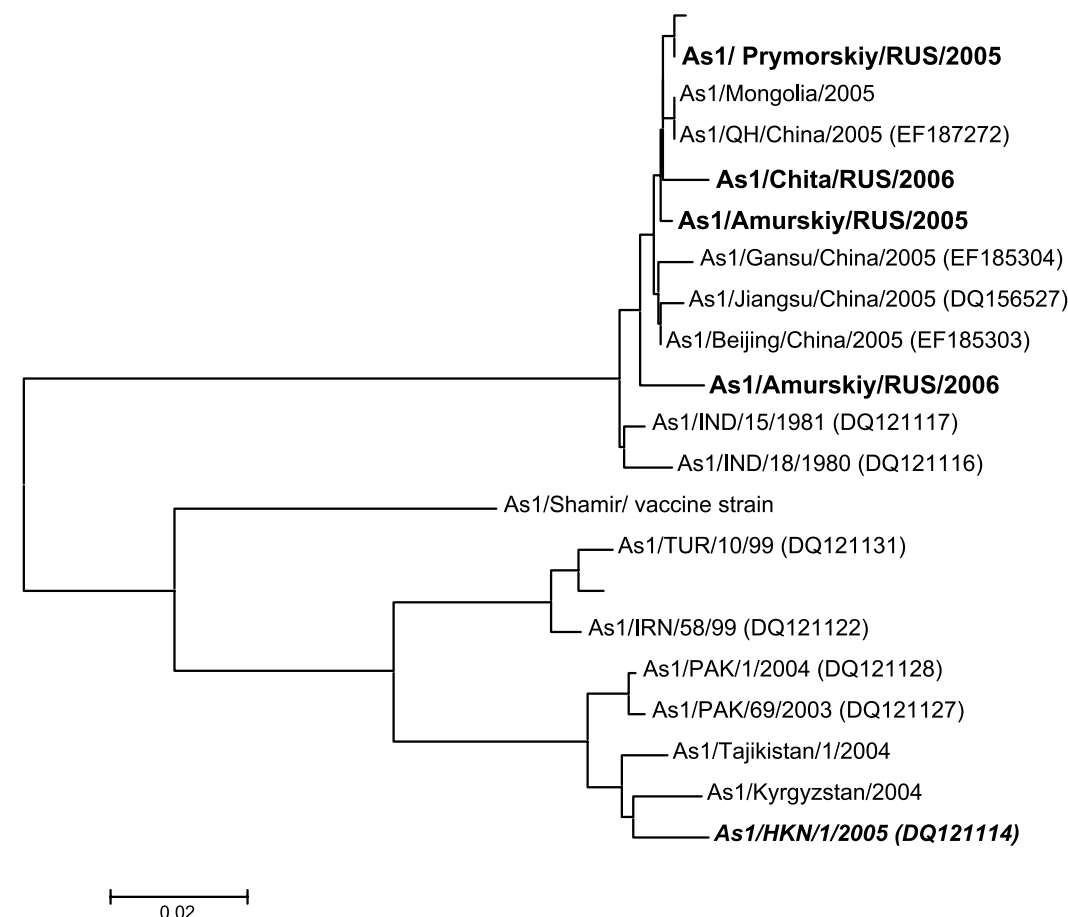


Рис. 2. Положение российских изолятов на филогенетическом древе ВЯ типа Азия-1. Дендрограмма основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP1

ко, учитывая локализацию вспышки (географически с. Усть-Ималка значительно ближе к Монголии, чем к с. Макарово и Китаю), можно предполагать занос ящура с территории Монголии.

В марте 2012 г. ящур типа О был зарегистрирован в с. Усачевка Хорольского района и с. Поспеловка Октябрьского района Приморского края РФ. Анализ показал, что изоляты, ответственные за вспышки ящура в этих населенных пунктах, отличаются между собой по двум нуклеотидным основаниям в гене VP1 и оба относятся к генетической линии PanAsia ВЯ серотипа О (рис. 1). Максимальный уровень идентичности (98,90%) приморские изоляты продемонстрировали с китайским изолятом O/CHA/7/2011 (номер JF837375 в GenBank). Из сообщений Всемирной референтной лаборатории по ящуре (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания) известно, что в 2010 г. штамм O-PanAsia вызвал многочисленные вспышки ящура во Вьетнаме, Камбодже и Лаосе [20]. Вероятно, именно из Юго-Восточной Азии этот вирус попал в 2011 г. в Китай, откуда затем был занесен в Восточный Казахстан (в августе 2011 г. и мае 2012 г.) и в Приморский край РФ.

Очень сложная ситуация по ящуре наблюдалась в РФ в 2013 г. Многочисленные вспышки ящура были зарегистрированы в Забайкальском крае (9 очагов) и Амурской области (6 очагов), а также, впервые за многие десятилетия, в Карачаево-Черкесской Республике (2 очага), Краснодарском крае (3 очага) и Кабардино-Балкарской Республике (1 очаг). Филогенетический анализ показал, что изоляты, ответственные за вспышки ящура на Дальнем Востоке и Северном Кавказе, относятся к разным генетическим линиям ВЯ типа А (рис. 3).

Вирус, вызвавший вспышки ящура в Карачаево-Черкесии, Кабардино-Балкарии и Краснодарском крае, относился к генетической линии A/Iran-05. Эта генетическая линия впервые была выявлена в Иране в 2003 г., в течение 2005–2006 гг. она распространилась по всей территории Ближнего Востока и доминирует в этом регионе до настоящего времени [15, 20]. За эти годы вирус значительно дивергировал, и в пределах генетической линии возникло множество сублиний. Большинство сублиний после появления быстро исчезает, однако некоторые сохраняются и доминируют в течение какого-то времени [12]. Начиная с 2011 г., в Турции доминирует сублиния SIS-10 ВЯ A/Iran-05 [15]. Именно к этой сублинии принадлежали и все российские изоляты, ответственные за вспышки ящура на Северном Кавказе в 2013 г. [20]. Занос ящура на территорию Северного Кавказа непосредственно из Турции маловероятен. Несмотря на то, что страны Закавказья официально не сообщают о вспышках ящура на своей территории, возможно, что ВЯ A/Iran-05^{SIS10} получил распространение в Закавказье, откуда, вероятно, и был занесен на территорию России.

Результаты филогенетического анализа свидетельствуют о том, что все вспышки ящура в Забайкальском крае и Амурской области РФ в 2013 г. были вызваны ВЯ типа А, принадлежащим к генетической линии A/Sea-97 (А/Юго-Восточная Азия-97). Эта генетическая

O-PanAsia. Многочисленные очаги ящура в Спасском районе Приморского края были обусловлены вирусом O/SEA/Mea-98 (рис. 1). Таким образом, в 2014 г. в Россию из КНР были занесены два разных топотипа ВЯ типа О.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных филогенетических исследований доказывают, что все вспышки ящура в России в период 1995–2014 гг. были вызваны заносом болезни из соседних азиатских стран, главным образом из Китая. Заносом ящура из КНР была обусловлена вспышка болезни в Московской области в 1995 г., а также все вспышки (за возможным единичным исключением) в Забайкалье и на Дальнем Востоке России в период 2000–2014 гг. Запрет на ввоз мясопродуктов из Китая, действовавший в период 2004–2014 гг., позволил защитить от ящура большинство регионов РФ, однако он оказался не способен предотвратить занос болезни на территории, непосредственно граничащие с КНР. Это может объясняться разными причинами: аэрогенным, водным и механическим путями передачи ящура, а также возможным нелегальным ввозом инфицированной животноводческой продукции из Китая в приграничные районы РФ.

Примечательно, что до 2000 г. Забайкалье и Дальний Восток России, так же как Япония, Корея и Монголия, были стабильно благополучны по ящуру на протяжении многих десятилетий. Кардинальное изменение ситуации по ящуру, произошедшее в этом регионе Азии на рубеже веков, вероятно, объясняется несколькими факторами.

Первый фактор природный. Он заключается в том, что в XX столетии в Китае был эндемичен только топотип Cathay (китайский) ВЯ типа О. Этот топотип имеет уникальную особенность. Он способен поражать только свиней и, в отличие от всех других топотипов вируса ящура, не вызывает клинического заболевания у рогатого скота [8]. В связи с этим способность к панзоотическому распространению китайского топотипа ВЯ невысока, и он не представлял большой опасности для стран — северных соседей КНР.

Второй фактор, определявший благополучие стран Дальнего Востока по ящуру в XX веке, связан с уровнем социально-экономического развития Китая. Большую часть века экономически слабо развитый Китай был своеобразным буфером, отделявшим Россию, Монголию, Корею и Японию от Юго-Восточной Азии, где эндемичен ящур трех типов: А, О и Азия-1. Все потенциальные панзоотии ящура, начинавшиеся в Юго-Восточной Азии, гасли на огромных просторах Китая из-за слабого развития внутренних и внешних торговых связей.

Однако к концу XX века ситуация принципиально изменилась. Быстрый экономический рост КНР привел к расширению социальных и торговых связей, как внутренних, так и внешних. В результате этого ящур из стран Юго-Восточной Азии стал чаще проникать в Китай и при этом получает широкое распространение, достигая северных территорий страны. Из барьера на пути этого заболевания Китай превратился в мост, по которому ящур из Юго-Восточной Азии начал достигать ранее благополучных по этой болезни Кореи, Японии, Монголии и России.

Как результат, за последние 15 лет в Восточной Азии имело место несколько панзоотий ящура. Они

были вызваны разными серотипами и генетическими линиями ВЯ: 1999–2000 гг. — О/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 гг. — Asia1, 2010 г. — О/SEA/Mya-98, 2012–2014 гг. — О/ME-SA/PanAsia, 2013 г. — А/Sea-97.

Все эти панзоотии, за исключением одной, обусловленной ВЯ типа Азия-1, имели сходные пути распространения: из Юго-Восточной Азии в Китай и далее из Китая в Россию, Монголию, Южную Корею и Японию. Это дает определенные основания для прогноза. Поскольку в странах Юго-Восточной Азии ящур типов О, А и Азия-1 в обозримом будущем будет оставаться эндемичным, ситуация по этому заболеванию в Забайкалье и на Дальнем Востоке России, а также в Монголии, Корее и Японии в значительной степени будет зависеть от способности Китая предотвращать проникновение на свою территорию ящура из Юго-Восточной Азии или, по крайней мере, сдерживать его распространение по стране. Опыт последних лет свидетельствует о том, что Китай пока не способен справиться с этой задачей. В этой ситуации Россия должна быть готова к возможному повторению панзоотий ящура в Восточной Азии.

Особую тревогу вызывает тот факт, что генетические линии ВЯ, занесенные в последние годы из стран Юго-Восточной Азии в Китай, «укореняются», приобретают энзоотический характер на территории КНР. Так, генетические линии О/SEA/Mya-98 и О/ME-SA/PanAsia циркулируют в Китае с 2010 и 2011 гг. соответственно. Это создает риск заноса ящура из КНР в Россию и в отсутствие панзоотий в Восточной Азии.

Как было отмечено выше, панзоотия ящура типа Азия-1, охватившая Восточную Азию в 2005–2006 гг., принципиально отличалась от остальных. Она началась не в Юго-Восточной Азии, а непосредственно в Китае. Учитывая, что серотип Азия-1 ВЯ в КНР не эндемичен, представляет интерес установление источника вспышек в Китае. Филогенетические исследования, проведенные во Всемирной референтной лаборатории по ящуру (Пирбрайт, Великобритания), показали, что китайские изоляты на 98–99% идентичны вирусу, выделенному в Индии еще в 1980–1981 гг. [20]. Этот факт очень необычен. ВЯ обладает очень высокой скоростью мутационной изменчивости, и вероятность его сохранения в естественных условиях в течение 25 лет практически в неизменном состоянии исключена. Однако чрезвычайно близкое родство вирусов 2005 г. и 1980–1981 гг. можно объяснить, если предположить, что в Китае использовалась вакцина против ящура типа Азия-1, изготовленная на основе одного из индийских штаммов.

По-видимому, ситуацию с распространением ящура типа Азия-1 в Восточной Азии можно представить следующим образом. В Китае ВЯ типа Азия-1 не эндемичен. Однако, учитывая возможность заноса этого типа ящура из соседних стран Юго-Восточной Азии и Индии, в КНР в 80-е гг. могла быть разработана вакцина против этого типа. Поскольку «родных» китайских штаммов ВЯ типа Азия-1 нет, вакцина была изготовлена на основе индийских штаммов. Вероятно, эта вакцина хранилась в резерве (банке вакцин) с 80-х гг. и ждала своего часа. Час настал в марте 2005 г. и был связан с возникновением вспышки ящура типа Азия-1 в Гонконге, вызванной заносом инфекции из Центральной Азии (изолят As1/HKN/1/2005 на рис. 2). Обеспокоенные возможностью распространения по стране этого заболевания, власти КНР, вероятно, ини-

циировали кампанию по массовой вакцинации скота против ящура данного типа. Поскольку постоянно вакцина против ящура типа Азия-1 в Китае на тот момент не производилась, она — вся или какая-то часть ее — была взята из резерва. В этом случае вакцина вполне могла стать источником инфекции. Дело в том, что в 80-е гг. при производстве вакцин ВЯ инаktivировали формалином. Вакцины, изготовленные по этой технологии, могут содержать не полностью инаktivированный вирус и таким образом вызывать поствакцинальный ящур. Так, Е. Beck и К. Strohmaier показали, что большинство эпизоотий и отдельных вспышек ящура в Западной Европе в период 1964–1984 гг. имели поствакцинальное происхождение [9].

На поствакцинальный характер эпизоотии ящура типа Азия-1 в Китае в 2005 г. указывают и особенности ее распространения. Многочисленные вспышки ящура начали регистрироваться практически одновременно (в апреле–мае 2005 г.) в различных провинциях КНР [19], что невозможно при естественном распространении болезни, однако вполне объясняется проведением повсеместной вакцинации. Китаю потребовалось несколько лет, чтобы ликвидировать катастрофические последствия этой вакцинации: ящур типа Азия-1 удалось ликвидировать лишь в 2009 г.

Таким образом, помимо природно-географических факторов (соседство с Юго-Восточной Азией) на ситуацию по ящуру в Китае влиял и так называемый человеческий фактор, связанный с ошибками в борьбе с болезнью. Можно предполагать, что в ближайшем будущем Китай останется основным «поставщиком» ящура в Россию.

Что касается ситуации по ящуру на Северном Кавказе РФ, то она в будущем будет зависеть от многих факторов: степени распространения ящура в странах Закавказья, интенсивности экономических и социальных связей населения в приграничных регионах и др. Важным условием обеспечения благополучия по ящуру на Северном Кавказе является также эффективность противоящурной вакцинации в буферной зоне.

В последние годы значительно возросли риски заноса ящура в Россию из Казахстана. До 2011 г. ящур проникал на территорию этой страны исключительно с юга, через Кыргызстан. Южные области Казахстана были неблагополучны по ящуру, однако от них Россию отделяли обширные территории Центрального и Северного Казахстана. Начиная с 2011 г. появился еще один путь заноса ящура в Казахстан — восточный, из Китая. Для России опасность этого пути заключается в том, что в этом случае ящур заносится в Восточный Казахстан, т.е. на территории, непосредственно граничащие с нашей страной. Таким образом, риски заноса ящура в РФ из соседних азиатских стран имеют тенденцию к росту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молекулярная эпизоотология ящура в России и странах СНГ / А.В. Щербаков, В.Г. Андреев, В.В. Дрыгин, А.А. Гусев // Аграрная Россия. — 2002 — № 2. — С. 8–11.
2. Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура / А.В. Щербаков, А.М. Тимина, А.С. Яковлева, В.В. Дрыгин, В.М. Захаров // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 20–25.

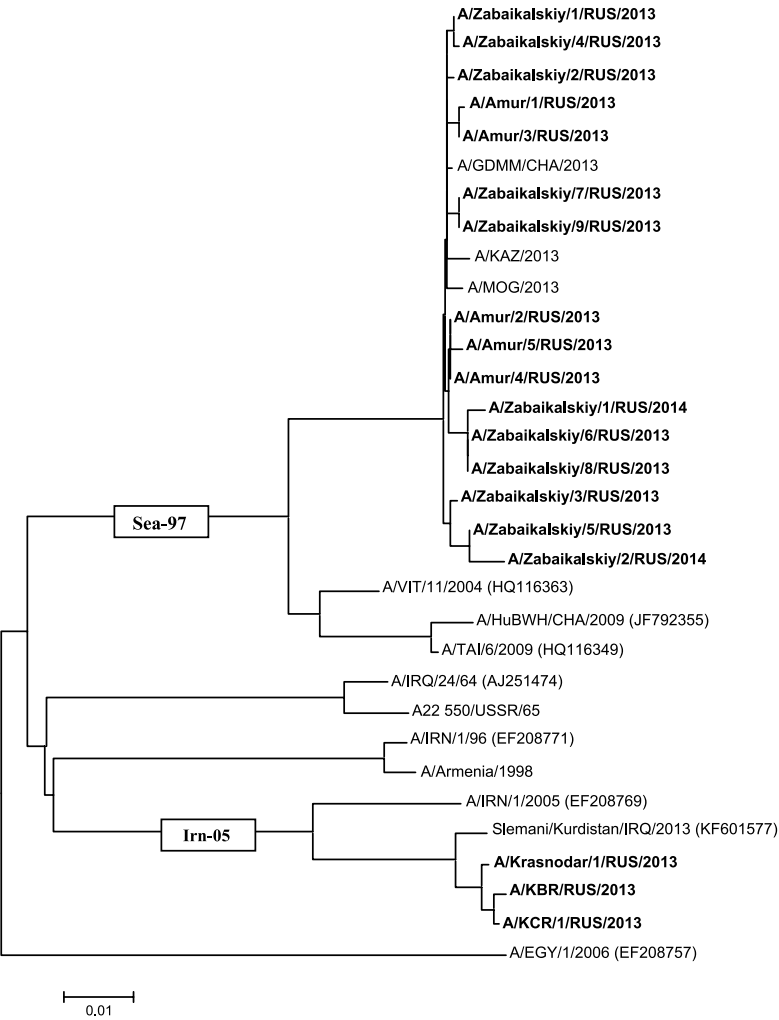


Рис. 3. Положение российских изолятов на филогенетическом древе ВЯ типа А. Дендрограмма основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP1

линия эндемична в странах Юго-Восточной Азии: Вьетнаме, Таиланде, Малайзии и др. Из сообщений Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [19] и Всемирной референтной лаборатории по ящуру (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания) [20] известно, что в 2013 г. этот вирус вышел за пределы своего естественного ареала и был занесен в Китай. Сравнение, проведенное с использованием банка нуклеотидных последовательностей WRL-FMD, показало, что российские изоляты из Забайкалья и Амурской области имеют максимальное генетическое родство (до 99,65%) именно с китайскими изолятами 2013 г. [20]. Это доказывает, что занос ящура в Забайкальский край и Амурскую область РФ произошел с территории Китая. Помимо России вспышки ящура, обусловленные ВЯ А/Sea-97, были зарегистрированы в 2013 г. в Восточном Казахстане и Монголии. Очевидно, что и в эти страны ящур был занесен из Китая. В 2014 г. ВЯ А/Sea-97 вызвал еще три вспышки в России — все в Забайкальском крае.

В 2014 г. помимо типа А в РФ были зарегистрированы вспышки ящура типа О. Вирус, вызвавший вспышку в с. Староцурухайтуй Приаргунского района Забайкальского края, принадлежал к генетической линии

3. Щербаков А.В., Перевозчикова Н.А., Дрыгин В.В. Методические указания по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1 // Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. — Владимир, 1998. — С. 31–41.

4. Щербаков А.В., Тимина А.М. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России и Монголии в 2010 г. // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2011. — Т. 9. — С. 5–11.

5. Щербаков А.В., Тимина А.М., Зиняков Н.Г. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России в 2013 году // Ветеринария. — 2014. — № 7. — С. 22–25.

6. Эпизоотическая ситуация по ящуру типа Азия-1 в России в 2005 году и анализ эффективности мер борьбы / К.Н. Груздев, Т.З. Байбиков, В.Н. Герасимов [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 3–19.

7. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis / A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev // The Veterinary Quarterly. — 1998. — Vol. 20, № 2. — P. 32–34.

8. Beard C.W., Mason P.W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus // J. Virol. — 2000 — Vol. 74, № 2. — P. 987–991.

9. Beck E., Strohmaier K. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination // J. Virol. — 1987. — Vol. 61. — P. 1621–1629.

10. Comparative sequence analysis of representative foot-and-mouth disease virus genomes from Southeast Asia / N.F. Abdul-Hamid, M. Firat-Saraç,

A.D. Radford [et al.] // Virus Genes. — 2011. — Vol. 43, № 1. — P. 41–45.

11. Emergence of a pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O / N.J. Knowles, A.R. Samuel, P.R. Davies [et al.] // European Commission for the control of FMD. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee Borovets, Bulgaria, 5–8 September, 2000. — P. 20–31.

12. Genetic basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease serotype A viruses from the Middle East / S. Upadhyaya, G. Ayelet, G. Paul [et al.] // Vaccine. — 2014. — Vol. 32, № 5. — P. 631–638.

13. Knowles N.J., Samuel A.R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus // Virus Res. — 2003. — Vol. 91, № 1. — P. 65–80.

14. Preliminary molecular analysis of FMD virus isolates collected on territories of Russia and the CIS in 1993–1994 / V.V. Drygin, A.V. Scherbakov, N.A. Perevozchikova, A.A. Gusev // Europ. Commis. FMD. Vienna. Austria, 19–22 September 1994. — Rome, 1994. — P. 8.

15. Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus type A in the Middle East / N.J. Knowles, M.H. Nazem Shirazi, J. Wadsworth [et al.] // Transbound Emerg Dis. — 2009. — Vol. 56, № 5. — P. 157–169.

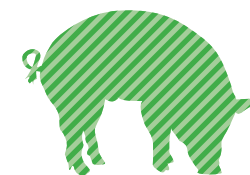
16. Recent spread of FMD virus serotype Asia 1 / J.F. Valarcher, N.J. Knowles, N.P. Ferris [et al.] // Vet. Record. — 2005. — July 2. — P. 30.

17. Samuel A.R., Knowles N.J. / Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes) // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82, № 3. — P. 609–621.

18. <http://www.foot-and-mouth.org>.

19. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation.

20. http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping.



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ p30, pK205R И pB602L В СЕРОДИАГНОСТИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

М.Р. Якупов¹, А.С. Яковлева², А.В. Щербаков³

¹ ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mapat.89@mail.ru

² старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Экспрессией в *E. coli* получены рекомбинантные белки p30, pK205R и pB602L вируса африканской чумы свиней. На основе рекомбинантных антигенов разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для обнаружения антител к вирусу африканской чумы свиней. Диагностическая специфичность тест-систем pK205R- и pB602L-ИФА составляла 99,8%, p30-ИФА — 99,5%. На референтной панели положительных сывороток диагностическая чувствительность составляла 100% для p30-ИФА и pK205R-ИФА и 94,12% — для pB602L-ИФА. При исследовании сывороток от экспериментально и естественно инфицированных животных p30-ИФА и pK205R-ИФА превосходили по чувствительности коммерческие тест-системы и были сравнимы с иммуноферментным анализом, который Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует для серодиагностики африканской чумы свиней. Международные слепые испытания по диагностике африканской чумы свиней подтвердили высокую специфичность и чувствительность тест-систем p30-ИФА и pK205R-ИФА.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммуноферментный анализ, рекомбинантные белки, антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожи и обширными геморрагиями во внутренних органах. Для АЧС характерно многообразие форм течения болезни: от сверхострой и острой со 100% летальностью до хронической.

АЧС эндемична в Африке, Сардинии (Италия), а с 2007 г. в Закавказье и России. Экономический ущерб, наносимый АЧС, складывается из прямых потерь по радикальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется сотнями миллионов долларов.

Возбудитель АЧС — крупный оболочечный вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Геном вируса АЧС, представленный двухцепочечной ДНК длиной 170–192 тысячи пар нуклеотидов, кодирует до 150 белков, из них не менее 28 являются структурными [11].

В связи с тем, что эффективные и безопасные вакцины против АЧС не разработаны, борьба с болезнью ведется путем ее диагностики и ликвидации очагов заболевания.

Лабораторная диагностика АЧС основана на выявлении возбудителя болезни или антител к нему в крови и органах инфицированных животных. Методы прямого обнаружения вируса (выделение на культуре клеток, РПИФ, ПЦР) являются приоритетными для диагностики сверхострых и острых форм АЧС. Серологические методы предпочтительны для диагностики подострых и хронических форм болезни, обнаружение антител к вирусу АЧС является основным способом выявления животных, инфицированных низковирулентными штаммами [3].

В качестве основного метода серологической диагностики АЧС Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует иммуноферментный анализ (ИФА), где в качестве антигена используются частично очищенные препараты белков вируса АЧС, выращенного в культуре клеток MS (далее МЭБ-ИФА) [6]. Получение такого антигена трудно стандартизировать, и оно связано с биологическими рисками. Кроме того, при высокой чувствительности МЭБ-ИФА его специфичность относительно невысока [4]. В связи с этим активно ведутся исследования по получению и использованию в серодиагностике АЧС рекомбинантных антигенов, которые биологически безопасны,