

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

С.А. Чупин¹, М.И. Доронин², Е.В. Чернышова³, М.И. Шулпин⁴

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chupin@arriah.ru

² аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru

³ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chernishova@arriah.ru

⁴ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shulpin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Были определены нуклеотидные последовательности пяти изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской области. Определенные последовательности сравнили с данными, полученными для девяти изолятов, выявленных на территории Владимирской области ранее, а также с вирусами бешенства из других регионов Российской Федерации. По данным анализа тринадцать изолятов, выявленных на территории Владимирской области, относились к Центральной филогенетической группе вирусов бешенства, и один изолят — к Евразийской группе. Изоляты из восточной части Владимирской области имеют особенности, отличающие их от прочих изолятов.

Ключевые слова: вирус бешенства, филогенетика, нуклеотидное секвенирование.

GENETIC CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS ISOLATES DETECTED IN THE TERRITORY OF THE VLADIMIR OBLAST

S.A. Chupin¹, M.I. Doronin², Ye.V. Chernyshova³, M.I. Shulpin⁴

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chupin@arriah.ru

² post-graduate student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru

³ Leading veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chernishova@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shulpin@arriah.ru

SUMMARY

Nucleotide sequences of five rabies virus isolates detected in the territory of the Vladimir Oblast were determined. Certain sequences were compared with those of nine isolates detected earlier in the territory of the Vladimir Oblast as well as with rabies viruses from other regions of the Russian Federation. According to the data of the analysis thirteen isolates detected in the territory of the Vladimir Oblast belonged to the Central Phylogenetic Group of rabies viruses and one isolate belonged to the Eurasian Group. Isolates from the eastern part of the Vladimir Oblast have peculiarities making the difference between them and other isolates.

Key words: rabies virus, phylogenetics, nucleotide sequencing.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих лет бешенство остается актуальной проблемой в Российской Федерации. Так, например, только в 2014 г. зарегистрировано 2096 неблагополучных пунктов и 2315 заболевших животных [1, 2].

Во Владимирской области эпизоотическая ситуация по бешенству вызывает серьезные опасения. Так, по официальным данным ФГБУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ в 2014 г. в области зарегистрирован 101 случай бешенства среди животных, что более чем в два раза больше, чем в предыдущем году (39 случаев). Наиболее неблагополучными районами во Владимирской области в 2014 г. были Ковровский, Меленковский, Вязниковский и Гороховецкий. При этом на территории области есть районы, где бешенство регистрируется в единичных случаях. Большая часть случаев бешенства ассоциирована с дикими животными, в первую очередь с лисицами.

Таким образом, изучение ситуации по бешенству требует пристального внимания. Одним из подходов изучения инфекции является молекулярно-генетический анализ. Он помогает в ряде случаев понять особенности популяций вируса, циркулирующих на определенной территории, пути распространения вируса и пр.

Целью данной работы являлась генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован патологический материал (головной мозг) от животных с подозрением на бешенство, поступающий на исследование в лабораторию бешенства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) из региональных лабораторий Российской Федерации. Для сравнительного анализа были использованы нуклеотидные последовательности гена N штаммов вируса бешенства, опубликованные в базе данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской области, для которых была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена N, дана в таблице.

Характеристика девяти ранее изученных изолятов, выявленных на территории Владимирской области (изоляты 51/2001, 189/2001, 190/2001, 869/2005, 125/2009, 612/2009, 613/2009, 211/2010, 244/2010), представлена ранее [3, 5].

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР фрагмента гена N осуществляли, как описано ранее [4].

Полученные ампликоны секвенировали с применением праймеров, которые использовались в ПЦР, и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном ДНК-секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США). Анализ и выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ BioEdit version 7.0.5.2. Филогенетический анализ проводили с помощью алгоритма «maximum likelihood», встроенного в программу MEGA version 6 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 2010 по 2014 гг. было охарактеризовано пять изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской области. В результате секвенирования ампликонов, полученных в ПЦР, были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена N изолятов вируса бешенства длиной 334 нукле-

отида (положение в гене N: 582–915). Последовательности еще девяти изолятов, выявленных на территории Владимирской области, были определены ранее [3, 5].

На рисунке представлено дерево, отражающее филогенетические отношения изолятов вируса бешенства, выявленных в разное время на территории Владимирской области. Для наглядности на дереве также представлены изоляты из других регионов Российской Федерации, генетически наиболее близкие к рассматриваемым изолятам, а также представители из разных филогенетических групп и штаммы вируса бешенства, используемые для производства антирабических вакцин, — RV-97 и ERA.

Согласно рисунку, из четырнадцати изученных изолятов вируса бешенства тринадцать относятся к Центральной филогенетической группе и один изолят — к Евразийской филогенетической группе.

Владимирские изоляты, относящиеся к Центральной группе, можно условно разделить на две генетические линии. Для удобства описания назовем эти линии «а» и «b» (рисунок). Представители генетической линии «а» отличаются друг от друга не более чем на один нуклеотид (0,3%) на изученном участке генома; представители группы «b» имеют идентичные нуклеотидные последовательности; в то же время представители этих двух линий отличаются друг от друга на 4–5 нуклеотидов (1,2–1,5%).

К генетической линии «а» относятся девять владимирских изолятов: 565/2010, 125/2009, 190/2001, 189/2001, 51/2001, 1385/2012, 869/2005, 1379/2012 и 28/2014. Характерно, что практически идентичные изоляты выявлялись на протяжении всего срока наблюдения: с 2001 по 2014 гг. Также представляет интерес тот факт, что идентичные или почти идентичные владимирские изоляты выявлялись также во многих других регионах центральной части России: Московской, Костромской, Ивановской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областях. Представители этой генетической линии были выявлены почти во всех изученных районах Владимирской области: Собинском, Камешковском, Судогодском, Гусь-Хрустальном, Суздальском, Петушинском и Муромском районах. Учитывая все вышеизложенное, можно сказать, что представители генетической линии «а» являются «типичными» для Центральной филогенетической группы вируса бешенства в центральных областях России.

К генетической линии «b» относятся четыре изолята, выявленных в Гороховецком, Вязниковском и Селивановском районах (изоляты 612/2009, 613/2009, 211/2010 и 244/2010). Эти изоляты идентичны на изученном участке генома и отличаются от всех ранее

Таблица
Характеристика изолятов вируса бешенства,
выявленных на территории Владимирской области

№	Название изолята	Место выявления	Животное, у которого был выявлен вирус
1	565/2010	Собинский район	енотовидная собака
2	1379/2012	Собинский район	лисица
3	1385/2012	Петушинский район	лисица
4	595/2013	Меленковский район	КРС
5	28/2014	Собинский район	лисица

изученных изолятов минимум на 4 нуклеотида (1,2%). По месту выявления изоляты генетической линии «b» локализованы в восточной части Владимирской области. Характерно, что в этих районах отмечается высокая частота случаев бешенства по сравнению с другими районами. Интересно также, что в этих районах не выявлено вирусов генетической линии «a».

Изолят 595/2013 относится к Евразийской филогенетической группе. Ему идентичны изоляты 1634/2008, 18/2002, 213/2010 и 371/2013, выявленные в Саратовской, Пензенской, Нижегородской и Самарской областях соответственно. Характерно, что изолят 213/2010, идентичный изоляту 595/2013, был выявлен в западной части Нижегородской области, неподалеку от Меленковского района, где был выявлен изолят 595/2013, что косвенно указывает на то, что данный изолят был не результатом случая заноса, а входит в ареал распространения этой вариации вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая характеристика вирусов бешенства во Владимирской области в целом соответствует картине, характерной для центра России. Все выявленные изоляты относятся к ранее описанным филогенетическим группам — Центральной и Евразийской. Особенности субпопуляции вируса бешенства в восточной части Владимирской области (генетическая линия «a») заслуживают более пристального изучения. Некоторые районы Владимирской области остались необследованными. Так, например, не изучены изоляты из Ковровского района, в котором в 2014 г. отмечалось наибольшее число случаев бешенства. Таким образом, требуется дальнейшая работа по выявлению и генетической характеристике изолятов вируса бешенства во Владимирской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прогноз по бешенству для территории Российской Федерации на 2015 год / М.И. Шульпин, Н.А. Назаров, С.А. Чупин [и др.] // Прогнозы по ряду болезней

животных в Российской Федерации на 2015 год. — Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2015. — С. 51–76.

2. Чернышова Е.В., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу // Ветеринария сегодня. — 2013. — № 4 (7). — С. 49–51.

3. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. // Вопросы вирусологии. — 2013. — № 4. — С. 44–49.

4. Antigenic and molecular characterization of field and vaccine rabies virus strains in the Russian Federation / A.E. Metlin, S.S. Rybakov, K.N. Gruzdev [et al.] // Dev. Biol. — 2006. — Vol. 125. — P. 33–37.

5. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses / A.E. Metlin, S. Rybakov, K. Gruzdev [et al.] // Arch. Virol. — 2007. — Vol. 152. — P. 1645–1654.

6. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.

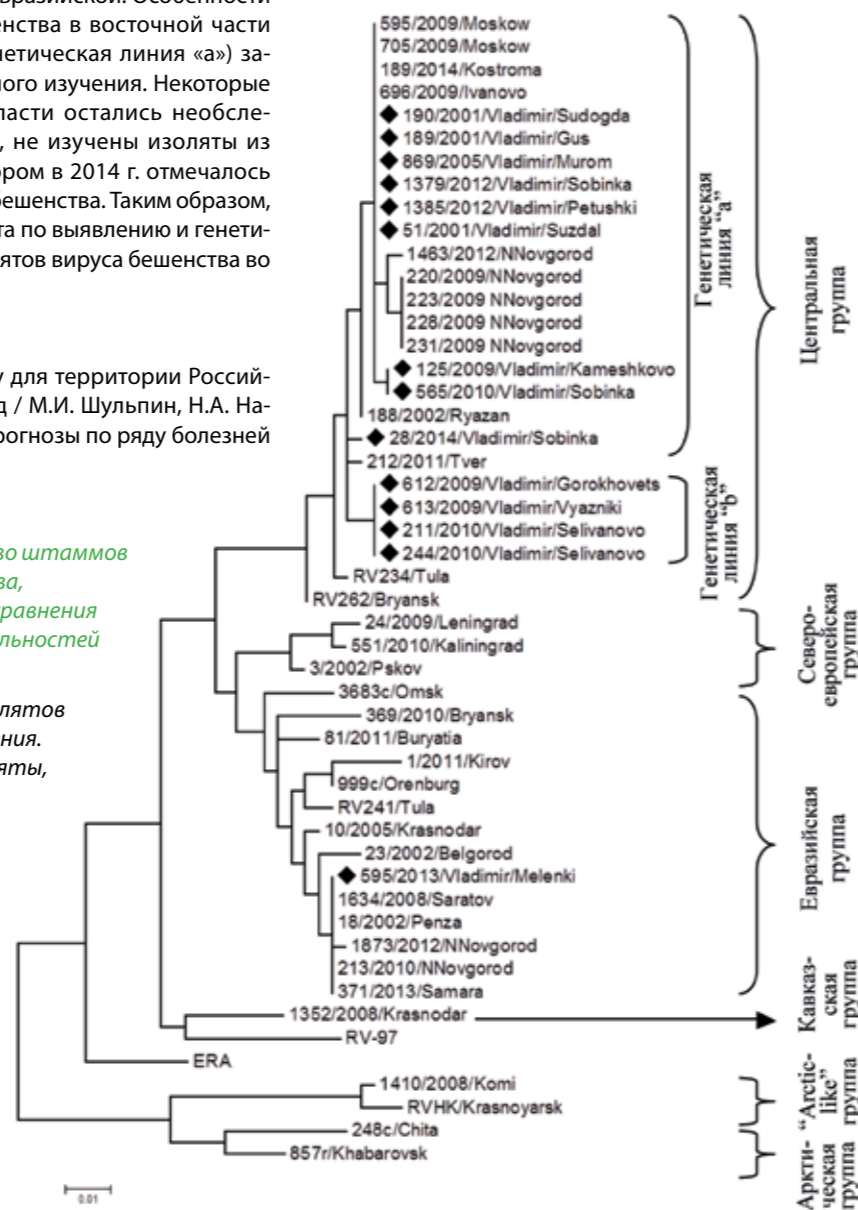


Рис. Филогенетическое дерево штаммов и изолятов вируса бешенства, построенное на основании сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена N

К названиям штаммов и изолятов добавлен регион происхождения. Знаком ♦ маркированы изоляты, выявленные на территории Владимирской области.

УДК 619:636:612.1

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Д.С. Большаков¹, Т.Б. Никешина²

¹ научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе описано значение основных биохимических показателей (белков, липидов, углеводов, пигментов, низкомолекулярных азотистых и минеральных веществ) в сыворотке (плазме) крови сельскохозяйственных животных.

Изменение содержания (снижение или повышение) этих параметров относительно нормального уровня может иметь различные причины: незаразные и инфекционные заболевания, несбалансированность рациона и режима кормления.

Ключевые слова: биохимический анализ, биохимические показатели, сыворотка крови сельскохозяйственных животных.

UDC 619:636:612.1

BIOCHEMICAL VALUES OF BLOOD SERA FROM FARM ANIMALS

D.S. Bolshakov¹, T.B. Nikeshina²

¹ Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

The significance of the main biochemical values (proteins, lipids, carbohydrates, colouring agents, low-molecular nitrogenous and mineral matters) in blood sera (plasm) from farm animals is described in the paper.

The change in the content (decrease or increase) of these indicators against the normal level can have different reasons: noncontagious and infectious diseases, imbalance of ration and feeding regime.

Key words: Ibiochemical analysis, biochemical values, blood sera from farm animals.