



Применение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для изучения ситуации по сенекавирусной инфекции в России

М. В. Тиманов¹, А. М. Тимина², М. В. Бирюченкова³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7496-3043>, e-mail: timanov@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9131-8839>, e-mail: biruchenkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Сенекавирус – новый вирус, принадлежащий к роду *Senecavirus* семейства *Picornaviridae*, ранее называвшийся вирусом долины Сенека, который может вызывать идиопатическую везикулярную болезнь, клинически неотличимую от ящура, везикулярной стоматиты и везикулярной болезни свиней, тем самым представляя большую угрозу для свиноводческих хозяйств. В последние годы в зарубежной литературе приводятся сведения о присутствии сенекавируса А в стадах свиней таких стран, как Бразилия, США, Колумбия, Китай и Таиланд. Для обеспечения контроля сенекавирусной инфекции решающее значение имеет точная диагностика. В настоящей работе представлены результаты изучения ситуации по данному заболеванию в Российской Федерации с использованием методов генодиагностики. В исследовании были использованы праймеры и зонды для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, описанные V. L. Fowler et al. в 2017 г., однако условия проведения реакции были оптимизированы. Анализ специфичности метода показал отсутствие перекрестной реактивности с другими тестируемыми вирусами. С помощью разработанного метода обнаружения вирусной РНК было изучено распространение сенекавируса в свиноводческих хозяйствах на территории Российской Федерации. В период с 2018 по 2020 г. было исследовано 1577 образцов биологического материала от свиней разных возрастных групп из 112 хозяйств 37 регионов страны. Сенекавирус был обнаружен в одном из хозяйств Уральского федерального округа. Есть предположение, что на данный свинокомплекс инфекционный агент попал при введении хозяйства в эксплуатацию в 2015 г. и комплектовании племенным молодняком, ввезенным из Канады. Это первое сообщение об обнаружении сенекавируса на территории Российской Федерации. Поскольку существует угроза заноса возбудителя из других стран, возникает необходимость изучения и контроля сенекавирусной инфекции. Разработанный метод может быть использован в качестве потенциального, чувствительного метода для диагностики данного инфекционного заболевания.

Ключевые слова: сенекавирус, полимеразная цепная реакция в реальном времени, биоматериал от животных

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Тиманов М. В., Тимина А. М., Бирюченкова М. В. Применение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для изучения ситуации по сенекавирусной инфекции в России. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (4): 341–346. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-4-341-346.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Тиманов Максим Викторович, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: timanov@arriah.ru.

Use of real-time polymerase chain reaction for investigation of Senecavirus infection occurrence in Russia

M. V. Timanov¹, A. M. Timina², M. V. Biryuchenkova³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7496-3043>, e-mail: timanov@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9131-8839>, e-mail: biruchenkova@arriah.ru

SUMMARY

Senecavirus, previously known as Seneca valley virus, is an emerging virus belonging to *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family, that can cause idiopathic vesicular disease clinically indistinguishable from foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis and swine vesicular disease and thereby posing a great threat for pig holdings. Recently, evidence of Senecavirus A occurrence in pig herds in such countries as Brazil, the USA, Colombia, China and Thailand has been provided in foreign literature. Accurate diagnosis is crucial for of Senecavirus infection control. Results of studying the disease situation with genodiagnostic methods in the Russian Federation are presented in the paper. Primers and probe for real-time RT-PCR described by V. L. Fowler et al. in 2017 were used but the reaction conditions were optimized.

Analysis of the method for its sensitivity showed absence of cross-reactivity with other tested viruses. The developed method for virus RNA detection was used to investigate senecavirus occurrence in pig holdings in the Russian Federation. A total of 1,577 samples of biological materials collected from pigs of different ages in 112 holdings located in 37 regions of the country were tested during 2018–2020. Senecavirus was detected in one holding located in the Urals Federal Okrug. It was supposed that the infectious agent had entered the said pig holding at the time of putting of the said holding into operation in 2015 and introduction of young breeding animals imported from Canada. This is the first report on Senecavirus detection in the Russian Federation. The threat of the pathogen introduction from other countries requires further Senecavirus infection investigation and control. The developed method can be used as a potential sensitive method for the said infectious disease diagnosis.

Keywords: Senecavirus, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rt RT-PCR), biomaterials from animals

Acknowledgements: The work was funded by the FGBI "ARRIAH" as a part of the research activities "Animal Health and Welfare".

For citation: Timanov M. V., Timina A. M., Biryuchenkova V. V. Use of real-time polymerase chain reaction for investigation of Senecavirus infection occurrence in Russia. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (4): 341–346. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-4-341-346.

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

For correspondence: Maksim V. Timanov, Leading Veterinarian, Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: timanov@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Сенекавирус (*Senecavirus*, Seneca Valley virus, или вирус долины Сенека) представляет собой безоболочечный вирус, содержащий одноцепочечную (+)РНК, принадлежащий к роду *Senecavirus* семейства *Picornaviridae*. Геном сенекавируса имеет размер приблизительно 7200 пар нуклеотидов и состоит из нетранслируемых областей на обоих концах генома (5'-UTR и 3'-UTR) и большой открытой рамки считывания (ORF), которая кодирует один большой полипротеин, расщепляющийся на лидерный белок (L), 4 структурных белка (VP1–VP4) и 7 неструктурных белков (2A–2C и 3A–3D) [1, 2].

Сенекавирус – относительно новый и малоизученный вирус. Первоначально он был идентифицирован как контаминант культуры клеток сетчатки глаза человека (PER.C6) в 2002 г. в лабораториях Национальной ветеринарной службы Министерства сельского хозяйства США (NVSL) и использовался многими исследователями в качестве онколитического агента для лечения нейроэндокринных опухолей человека [3–5]. В 2005 г. N. J. Knowles and P. Hallenbeck была описана полная последовательность генома, а уже в 2008 г. в Канаде были получены доказательства того, что сенекавирус связан с идиопатической везикулярной болезнью свиней [6, 7].

Интерес к изучению сенекавируса значительно вырос в последние несколько лет.

Первая вспышка сенекавирусной инфекции в свиноводческих хозяйствах была зарегистрирована в Канаде в 2007 г. [7]. Впоследствии в США в 2012 г. у 6-месячного поросенка были зафиксированы клинические симптомы идиопатической везикулярной болезни свиней, установлено, что причиной заболевания является сенекавирус [8]. Первой провинцией Китая, сообщившей о выявлении сенекавируса в 2015 г., была Гуандун, а затем появились данные о заражении инфекционным агентом свиней в центральных и северных регионах страны. В настоящее время по меньшей мере 14 провинций страны поражены вирусом, но Гуандун остается одной из тех, где частота выявления возбудителя самая высокая. Китайский центр здоровья животных и эпиде-

миологии (CAHEC) сообщил, что только 3 провинции не были затронуты сенекавирусом А [9–11]. С 2014 г. многочисленные случаи возникновения инфекции, вызванной сенекавирусом, также были подтверждены в таких странах, как Бразилия [1, 3, 12–14], Колумбия [15], Таиланд [16] и Вьетнам [17], что указывает на широкое распространение возбудителя в животноводческих хозяйствах разных стран в течение нескольких лет.

Клинические проявления идиопатической везикулярной болезни, вызванной сенекавирусом, неотличимы от таковых при особо опасных болезнях животных, вызванных другими родственными вирусами, такими как вирус везикулярной болезни свиней, вирус везикулярной экзантемы и вирус ящура. Почти во всех случаях у животных наблюдается схожая клиническая картина. У взрослых свиней и поросят-отъемышей появляются везикулы на морде, коронарных связках, губах; образуются афты во рту; могут иметь место межпальцевые поражения, поражения копытного венчика и стопы, приводящие к хромоте; развиваются лихорадка и вялость. Лопнувшие везикулы превращаются в глубокие язвы, которые затягиваются в течение 14 дней. Кроме того, у поросят первой недели жизни могут возникать мышечная слабость, летаргия, чрезмерное слюноотделение, гиперемия кожи, диарея, неврологические проявления и наступает внезапная смерть (так называемая эпидемическая транзиторная неонатальная болезнь). Клинические признаки имеют место в течение 3–10 дней, а затем у выживших животных исчезают [1, 15, 18–22].

Информация о путях передачи сенекавируса на данный момент в литературе представлена в небольшом объеме. Важным способом передачи данного инфекционного агента, вероятно, является прямой контакт. Вирус также выделяется с фекалиями и мочой. Возможна и вертикальная передача возбудителя, на что указывает обнаружение сенекавируса у одно- и двухсуточных поросят [4].

В настоящее время методов специфического лечения и вакцин для профилактики и контроля заболе-

вания, вызванного сенекавирусом А, не существует. Вероятно, это связано с большим разнообразием существующих изолятов.

Современные лабораторные методы, разработанные для диагностики сенекавирусной инфекции, включают выделение вируса в культуре клеток, реакцию нейтрализации вируса, конкурентный иммуоферментный анализ (ИФА), традиционную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ОТ-ПЦР в реальном времени [18].

Целью данной работы было изучение ситуации по сенекавирусной инфекции в России с использованием методов генодиагностики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Референтные штаммы. В качестве положительных контрольных образцов при отработке метода и проведения анализа использовали штаммы сенекавируса: СА-01-131395 и MN-88-36695, полученные из Института Пирбрайта (Великобритания).

Для проверки специфичности теста использовали штаммы вируса ящура (О/Саудовская Аравия/08, А/Турция/06, Asia-1/Shamir 3/89), вируса везикулярной болезни свиней (№ 663/73) из Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также культуру клеток ВНК-21.

Патологический материал. Диагностическим исследованиям подвергали пробы биологического материала, отобранные от свиней в свиноводческих хозяйствах России в 2018–2020 гг.

Выделение РНК из 10%-й суспензии биоматериала осуществляли с использованием 6 М гуанидин тиоцианата и стекловолокнистых фильтров GF/F [23].

ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Использовали праймеры и зонд, описанные V. L. Fowler et al. [18]. Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей по 0,5 мкл (5 пм) прямого и обратного праймеров, 0,5 мкл (5 пм) зонда, 2,5 мкл 10× буфера для ПЦР, 4 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,7 мкл 25 мМ NTPs, 0,2 мкл (1 ед) TaqДНК-полимеразы, 0,4 мкл (20 ед) MMLV ревертазы, 11 мкл воды без нуклеаз и 5 мкл РНК. Программа амплификации включала в себя этапы обратной транскрипции при 60 °С 30 мин с последующей денатурацией при 95 °С 10 мин и 50 циклов собственно ПЦР (денатурация при 95 °С 15 сек, отжиг и элонгация при 60 °С 1 мин). Все реакции проводили на термоциклере С1000 Touch™ с измерительным модулем CFX96 (Bio-Rad, США).

При валидации методики были определены такие характеристики метода, как предел детекции и специфичность, сходимость и воспроизводимость, эффективность амплификации [24, 25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ОТ-ПЦР-РВ использовали праймеры и зонд, описанные V. L. Fowler et al. [18], однако условия проведения реакции значительно отличались. В связи с этим в начале работы была проведена валидация метода.

Специфичность ОТ-ПЦР-РВ проверяли на РНК следующих вирусов: вируса ящура (О/Саудовская Аравия/08, А/Турция/06, Asia-1/Shamir 3/89), вируса везикулярной болезни свиней (№ 663/73), а также использовали культуру клеток ВНК-21 и РНК, выделенную из эпителия языка здоровых свиней (всего 9 проб). Положительный результат наблюдали только в образцах, содержащих РНК сенекавируса. Во всех остальных случаях результа-

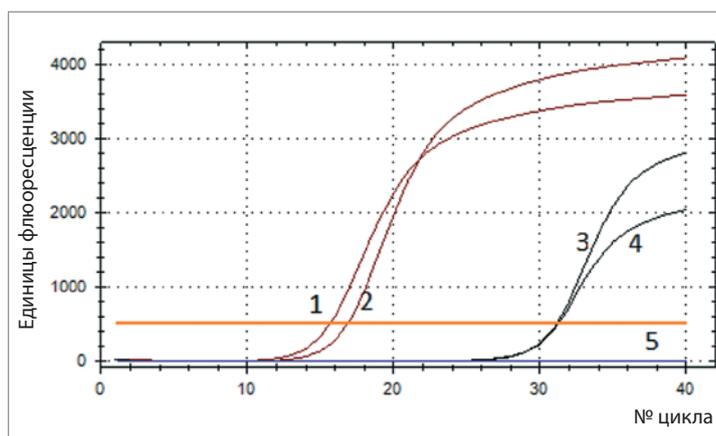


Рис. Обнаружение сенекавируса методом ОТ-ПЦР-РВ

Fig. Detection of Senecavirus with rtRT-PCR:

- 1 – референтный штамм сенекавируса CA-01-131395 / CA-01-131395 reference Senecavirus strain;
- 2 – референтный штамм сенекавируса MN-88-36695 / MN-88-36695 reference Senecavirus strain;
- 3 – полевой изолят сенекавируса (обнаружен в мозге поросенка) / field Senecavirus isolate (detected in piglet brain);
- 4 – полевой изолят сенекавируса (обнаружен в суставах поросенка) / field Senecavirus isolate (detected in piglet joints);
- 5 – пробы, отрицательные в отношении сенекавируса (вирус ящура, вирус везикулярной болезни свиней, культура клеток ВНК-21, эпителий здоровых свиней) / Senecavirus-negative samples (foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus, BHK-21 cell culture, normal pig epithelium)

ты реакции были отрицательными, что свидетельствует о специфичности метода (рис.).

Предел детекции определяли с использованием серии 10-кратных разведений сенекавируса штамма СА-01-131395. Исходный титр вируса составлял 6 lg ТЦД₅₀/мл. Предельное разведение, в котором обнаруживали вирус, содержало его в титре 10 ТЦД₅₀/мл.

Значения Ct для всех разведений находились в диапазоне от 12,2 до 31,14. Анализ данных с помощью программного обеспечения позволил построить стандартную кривую для этих разведений РНК и вычислить эффективность реакции, которая составила 92,3%.

При определении сходимости исследовали один и тот же образец в 10 повторностях, выполненных в одних и тех же условиях измерения (один прибор, один оператор, т. е. в условиях повторяемости). Учитывали степень близости результатов последовательных измерений одной и той же пробы (величину Ct). Коэффициент вариации (С) рассчитывали по формуле:

$$C = \sigma / X_{cp} \times 100\%,$$

где X – величина порогового цикла, определяемого в ОТ-ПЦР-РВ;

σ – среднее квадратичное отклонение, которое определяется по формуле $\sigma = (X_{\max} - X_{\min}) / K$, где K – коэффициент из таблицы С. И. Ермолаева; для 10 повторностей K = 3,08 [24, 25].

Получили $\sigma = (12,83 - 12,12) / 3,08 = 0,231$. Рассчитанное количественное значение коэффициента вариации составило $C = 0,231 / 12,444 \times 100\% = 1,86\%$ (табл.).

При определении воспроизводимости также исследовали один и тот же образец в 10 повторностях, выполненных при измененных условиях измерения: 1) одним исследователем в параллельных исследованиях в течение разного времени (10 дней) и 2) двумя

разными исследователями в параллельных исследованиях (в 10 повторях):

1) $\sigma = (13,37 - 12,11) / 3,74 = 0,337$ (для 20 повторностей $K = 3,74$),

$C = 0,337 / 12,483 \times 100\% = 2,70\%$;

2) $\sigma = (13,82 - 12,11) / 3,74 = 0,457$,

$C = 0,457 / 12,643 \times 100\% = 3,61\%$.

Расчитанное количественное значение коэффициента вариации составило 2,70% при исследовании одним оператором в разные дни, и 3,61% – при исследовании разными операторами (табл.).

Полученные значения коэффициента вариации (менее 10%) показывают, что изменчивость вариационного ряда незначительна и результаты однородны.

Таким образом, было установлено, что ОТ-ПЦР-РВ по своим характеристикам отвечает требованиям, предъявляемым к качественным методам измерений/испытаний и может применяться в диагностических исследованиях.

По результатам валидации метода были разработаны методические указания по обнаружению сенекавируса с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, которые применялись в дальнейшем для диагностики сенекавирусной инфекции в России.

В период с 2018 по 2020 г. с использованием ОТ-ПЦР-РВ на наличие генома сенекавируса было исследовано 1577 образцов патологического материала от свиней из 112 хозяйств 37 регионов РФ. Для анализа использовали весь имеющийся биологический материал от свиней различных возрастных групп: от эмбрионов до взрослых животных. Исследованиями были охвачены любые клинические проявления у свиней. Например, животные с везикулярными поражениями кожи и слизистых оболочек, неврологическими симптомами, кишечной патологией, респираторными и репродуктивными нарушениями, все случаи внезапного падежа, а также материал от клинически здоровых животных. Исследованиям были подвергнуты любые органы и ткани

животных, а также биологические жидкости. Ткани от свиней с везикулярными поражениями (афты, везикулы, папулы, пустулы) были взяты из очагов ящура.

Как видно на рисунке, в пробах полевого материала от поросят (мозге и суставах) при обнаружении сенекавируса наблюдается положительный сигнал флуоресценции.

Сенекавирус не был выявлен ни в эпителиальных тканях, ни в пробах паренхиматозных органов, ни в биологических жидкостях свиней, а все случаи везикулярных поражений у свиней в РФ в 2019 г. являлись следствием инфицирования вирусом ящура.

Однако в одном их хозяйств Челябинской области сенекавирус был обнаружен у поросят с неврологической симптоматикой и артритами. Судить о роли сенекавируса А в данной патологии достаточно трудно, так как в этом материале были обнаружены также бактериальные патогены, а именно *Streptococcus suis* [26]. Есть предположение, что на данный свинокомплекс сенекавирус попал с привезенным из Канады племенным молодняком в 2015 г. Вполне вероятно, что вирус клинически никак себя не проявлял.

В заключение можно сказать, что данное исследование представляет собой первое сообщение о заражении сенекавирусом свиней в России. Везикулярные заболевания у сельскохозяйственных животных являются клинически, экономически и эпидемиологически значимыми. А сенекавирус может выступать новым возбудителем, потенцирующим проявления везикулярной болезни. Следовательно, выявление данного инфекционного агента необходимо включить в дифференциальную диагностику классических вирусных везикулярных заболеваний, хотя инфекционное заболевание, обусловленное сенекавирусом, имеет более легкое течение и не оказывает большого экономического воздействия. Несмотря на единичный случай выявления сенекавируса в России, существует угроза его заноса из соседних стран и, следовательно, возникает необходимость изучения и контроля сенекавирусной инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован метод обнаружения сенекавируса с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Показано отсутствие перекрестных реакций с другими тестируемыми вирусами. Определен предел детекции сенекавируса (титр 10 ТЦД₅₀/мл). Определены основные валидационные характеристики данного метода: сходимость (коэффициент вариации – 1,86%) и воспроизводимость (коэффициент вариации – 2,70 и 3,61%). Дана оценка эффективности амплификации – 92,3%. Показано, что разработанный метод соответствует критериям, предъявляемым к качественным лабораторным методам исследования, и может применяться для лабораторной диагностики сенекавирусной инфекции.

2. На основе оптимизированного метода разработаны методические указания по обнаружению сенекавируса с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, которые могут применяться для диагностики сенекавирусной инфекции в животноводческих хозяйствах России.

3. В период с 2018 по 2020 г. с использованием разработанного метода проведен анализ биологического материала от свиней разных возрастных групп

Таблица

Значения порогового цикла при 30 повторях и коэффициенты вариации ОТ-ПЦР-РВ

Table

Real-time RT-PCR: Ct-values for 30 retests and coefficient of variance

Внутри одного прогона		На другом приборе		Другим оператором	
№ повтора	Ct	№ повтора	Ct	№ повтора	Ct
1	12,83	1	12,42	1	12,74
2	12,12	2	12,78	2	12,12
3	12,35	3	12,12	3	12,36
4	12,45	4	12,35	4	13,82
5	12,47	5	12,54	5	12,81
6	12,24	6	12,98	6	12,52
7	12,63	7	13,37	7	12,43
8	12,47	8	12,11	8	12,61
9	12,74	9	12,24	9	13,72
10	12,14	10	12,31	10	12,50
C = 1,86					
C = 2,70					
		C = 3,61			

на наличие сенекавируса на свиноккомплексах, расположенных на территории РФ. Исследовано 1577 образцов из 112 хозяйств 37 регионов России. Искомый инфекционный агент обнаружен в одном из хозяйств Уральского федерального округа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Leme R. A., Oliveira T. E., Alcântara B. K., Headley S. A., Alfieri A. F., Yang M., Alfieri A. A. Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22 (7): 1238–1241. DOI: 10.3201/eid2207.151583.
- Hales L. M., Knowles N. J., Reddy P. S., Xu L., Hay C., Hallenbeck P. L. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (Pt 5): 1265–1275. DOI: 10.1099/vir.0.83570-0.
- Laguardia-Nascimento M., Gasparini M. R., Sales É. B., Rivetti A. V. Jr, Sousa N. M., Oliveira A. M., et al. Molecular epidemiology of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. *Vet. J.* 2016; 216: 207–209. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.08.013.
- Leedom Larson K. R., Lambert T., Killoran K. Senecavirus A. Swine Health Information Center and Center for Food Security and Public Health. 2017. Режим доступа: <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-fact-sheet-senecavirus-a>.
- Leme R. A., Oliveira T. E. S., Alfieri A. F., Headley S. A., Alfieri A. A. Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets. *J. Comp. Pathol.* 2016; 155 (2–3): 145–155. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.06.011.
- Knowles N. J., Hallenbeck P. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. *EUROPIC 2005: XIII Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (23–29 May 2005, Lunteren, The Netherlands)*. 2005; Abstract A14: 23–29.
- Pasma T., Davidson S., Shaw S. L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.* 2008; 49 (1): 84–85. PMID: 18320985.
- Singh K., Corner S., Clark S. G., Scherba G., Fredrickson R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J. Vet. Sci. Technol.* 2012; 3 (6):123. DOI: 10.4172/2157-7579.1000123.
- Chen P., Yang F., Cao W., Liu H., Zhang K., Liu X., et al. The distribution of different clades of Seneca Valley viruses in Guangdong Province, China. *Viol. Sin.* 2018; 33 (5): 394–401. DOI: 10.1007/s12250-018-0056-8.
- Sun Y., Cheng J., Wu R. T., Wu Z. X., Chen J. W., Luo Y., et al. Phylogenetic and genome analysis of 17 novel Senecavirus A isolates in Guangdong Province, 2017. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5:314. DOI: 10.3389/fvets.2018.00314.
- Wang Z., Zhang X., Yan R., Yang P., Wu Y., Yang D., Bian C., Zhao J. Emergence of a novel recombinant Seneca Valley virus in Central China, 2018. *Emerg. Microbes. Infect.* 2018; 7 (1):180. DOI: 10.1038/s41426-018-0183-1.
- Vannucci F. A., Linhares D. C., Barcellos D. E., Lam H. C., Collins J., Marthaler D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62 (6): 589–593. DOI: 10.1111/tbed.12410.
- Leme R. A., Miyabe F. M., Dall Agnol A. M., Alfieri A. F., Alfieri A. A. A new wave of Seneca Valley virus outbreaks in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (3): 1101–1104. DOI: 10.1111/tbed.13151.
- Leme R. A., Miyabe F. M., Dall Agnol A. M., Alfieri A. F., Alfieri A. A. Seneca Valley virus RNA detection in pig feed and feed ingredients in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (4): 1449–1453. DOI: 10.1111/tbed.13215.
- Sun D., Vannucci F., Knutson T. P., Corzo C., Marthaler D. G. Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (5): 1346–1349. DOI: 10.1111/tbed.12669.
- Saeng-Chuto K., Rodtian P., Temeeyasen G., Wegner M., Nilubol D. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (1): 285–288. DOI: 10.1111/tbed.12654.
- Arzt J., Bertram M. R., Vu L. T., Pauszek S. J., Hartwig E. J., Smoliga G. R., et al. First detection and genome sequence of Senecavirus A in Vietnam. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8 (3):e01247-18. DOI: 10.1128/MRA.01247-18.
- Fowler V. L., Ransburgh R. H., Poulsen E. G., Wadsworth J., King D. P., Mioulet V., et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs. *J. Virol. Methods.* 2017; 239: 34–37. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.10.012.
- Liu C., Li X., Liang L., Li J., Cui S. Isolation and phylogenetic analysis of an emerging Senecavirus A in China, 2017. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 68: 77–83. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.12.009.
- Zhang J., Piñeyro P., Chen Q., Zheng Y., Li G., Rademacher C., et al. Genome Sequences of Senecavirus A from Recent Idiopathic Vesicular Disease Outbreaks in U.S. Swine. *Genome. Announc.* 2015; 3 (6):e01270-15. DOI: 10.1128/genomeA.01270-15.

- Montiel N., Buckley A., Guo B., Kulshreshtha V., VanGeelen A., Hoang H., et al. Vesicular Disease in 9-Week-Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1246–1248. DOI: 10.3201/eid2207.151863.
- Wu Q., Zhao X., Bai Y., Sun B., Xie Q., Ma J. The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (5): 1633–1640. DOI: 10.1111/tbed.12557.
- Грибанов О. Г., Щербаков А. В., Перевозчикова Н. А., Гусев А. А. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид и РНК. *Биохимия.* 1996; 61 (6): 1064–1070. Режим доступа: https://biochemistry.moscow.com/ru/archive/1996/61-06-1064/#_pdf.
- Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Корнеева Н. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть 1). *Ремедиум.* 2003; 10: 69–71. eLIBRARY ID: 18345770.
- Поляков И. З., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике. Л.: Медицина; 1975. 151 с.
- Бирюченкова М. В., Тимина А. М. Разработка методов обнаружения генома *Streptococcus suis* на основе полимеразной цепной реакции. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных.* 2017; 15: 70–81. eLIBRARY ID: 35138112.

REFERENCES

- Leme R. A., Oliveira T. E., Alcântara B. K., Headley S. A., Alfieri A. F., Yang M., Alfieri A. A. Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22 (7): 1238–1241. DOI: 10.3201/eid2207.151583.
- Hales L. M., Knowles N. J., Reddy P. S., Xu L., Hay C., Hallenbeck P. L. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (Pt 5): 1265–1275. DOI: 10.1099/vir.0.83570-0.
- Laguardia-Nascimento M., Gasparini M. R., Sales É. B., Rivetti A. V. Jr, Sousa N. M., Oliveira A. M., et al. Molecular epidemiology of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. *Vet. J.* 2016; 216: 207–209. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.08.013.
- Leedom Larson K. R., Lambert T., Killoran K. Senecavirus A. Swine Health Information Center and Center for Food Security and Public Health. 2017. Available at: <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-senecavirus-a>.
- Leme R. A., Oliveira T. E. S., Alfieri A. F., Headley S. A., Alfieri A. A. Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets. *J. Comp. Pathol.* 2016; 155 (2–3): 145–155. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.06.011.
- Knowles N. J., Hallenbeck P. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. *EUROPIC 2005: XIII Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (23–29 May 2005, Lunteren, The Netherlands)*. 2005; Abstract A14: 23–29.
- Pasma T., Davidson S., Shaw S. L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.* 2008; 49 (1): 84–85. PMID: 18320985.
- Singh K., Corner S., Clark S. G., Scherba G., Fredrickson R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J. Vet. Sci. Technol.* 2012; 3 (6):123. DOI: 10.4172/2157-7579.1000123.
- Chen P., Yang F., Cao W., Liu H., Zhang K., Liu X., et al. The distribution of different clades of Seneca Valley viruses in Guangdong Province, China. *Viol. Sin.* 2018; 33 (5): 394–401. DOI: 10.1007/s12250-018-0056-8.
- Sun Y., Cheng J., Wu R. T., Wu Z. X., Chen J. W., Luo Y., et al. Phylogenetic and genome analysis of 17 novel Senecavirus A isolates in Guangdong Province, 2017. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5:314. DOI: 10.3389/fvets.2018.00314.
- Wang Z., Zhang X., Yan R., Yang P., Wu Y., Yang D., Bian C., Zhao J. Emergence of a novel recombinant Seneca Valley virus in Central China, 2018. *Emerg. Microbes. Infect.* 2018; 7 (1):180. DOI: 10.1038/s41426-018-0183-1.
- Vannucci F. A., Linhares D. C., Barcellos D. E., Lam H. C., Collins J., Marthaler D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62 (6): 589–593. DOI: 10.1111/tbed.12410.
- Leme R. A., Miyabe F. M., Dall Agnol A. M., Alfieri A. F., Alfieri A. A. A new wave of Seneca Valley virus outbreaks in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (3): 1101–1104. DOI: 10.1111/tbed.13151.
- Leme R. A., Miyabe F. M., Dall Agnol A. M., Alfieri A. F., Alfieri A. A. Seneca Valley virus RNA detection in pig feed and feed ingredients in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (4): 1449–1453. DOI: 10.1111/tbed.13215.
- Sun D., Vannucci F., Knutson T. P., Corzo C., Marthaler D. G. Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (5): 1346–1349. DOI: 10.1111/tbed.12669.
- Saeng-Chuto K., Rodtian P., Temeeyasen G., Wegner M., Nilubol D. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (1): 285–288. DOI: 10.1111/tbed.12654.
- Arzt J., Bertram M. R., Vu L. T., Pauszek S. J., Hartwig E. J., Smoliga G. R., et al. First detection and genome sequence of Senecavirus A in Vietnam. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8 (3):e01247-18. DOI: 10.1128/MRA.01247-18.
- Fowler V. L., Ransburgh R. H., Poulsen E. G., Wadsworth J., King D. P., Mioulet V., et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs. *J. Virol. Methods.* 2017; 239: 34–37. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.10.012.
- Liu C., Li X., Liang L., Li J., Cui S. Isolation and phylogenetic analysis of an emerging Senecavirus A in China, 2017. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 68: 77–83. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.12.009.
- Zhang J., Piñeyro P., Chen Q., Zheng Y., Li G., Rademacher C., et al. Genome Sequences of Senecavirus A from Recent Idiopathic Vesicular Disease Outbreaks in U.S. Swine. *Genome. Announc.* 2015; 3 (6):e01270-15. DOI: 10.1128/genomeA.01270-15.

17. Arzt J., Bertram M. R., Vu L. T., Pauszek S. J., Hartwig E. J., Smoliga G. R., et al. First detection and genome sequence of Senecavirus A in Vietnam. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8 (3):e01247-18. DOI: 10.1128/MRA.01247-18.
18. Fowler V. L., Ransburgh R. H., Poulsen E. G., Wadsworth J., King D. P., Mioulet V., et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs. *J. Virol. Methods.* 2017; 239: 34–37. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.10.012.
19. Liu C., Li X., Liang L., Li J., Cui S. Isolation and phylogenetic analysis of an emerging Senecavirus A in China, 2017. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 68: 77–83. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.12.009.
20. Zhang J., Piñeyro P., Chen Q., Zheng Y., Li G., Rademacher C., et al. Genome sequences of Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U.S. swine. *Genome Announc.* 2015; 3 (6):e01270-15. DOI: 10.1128/genomeA.01270-15.
21. Montiel N., Buckley A., Guo B., Kulshreshtha V., VanGeelen A., Hoang H., et al. Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with Senecavirus A. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22 (7): 1246–1248. DOI: 10.3201/eid2207.151863.
22. Wu Q., Zhao X., Bai Y., Sun B., Xie Q., Ma J. The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (5): 1633–1640. DOI: 10.1111/tbed.12557.
23. Gribanov O. G., Shcherbakov A. V., Perevozchikova N. A., Gusev A. A. The use of Aerosil A-300 and GF/F (GF/C) filters for purification of DNA fragments, plasmid DNA and RNA. *Biochemistry (Moscow)*. 1996; 61 (6): 1064–1070. Available at: https://biochemistry.moscow.com/ru/archive/1996/61-06-1064/#_pdf. (in Russ.)
24. Nosyrev P., Nosyreva M., Rasskazova T., Korneeva N. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika (chast' 1) = Validation of analytical methods: theory and practice (Part 1). *Remedium*. 2003; 10: 69–71. eLIBRARY ID: 18345770. (in Russ.)
25. Polyakov I. Z., Sokolova N. S. Practical Guide for medical statistics. Leningrad: Meditsina; 1975. 151 p. (in Russ.)
26. Biryuchenkova M. V., Timina A. M. Development of methods for *Streptococcus suis* genome detection based on polymerase chain reaction. *Proceedings of the Federal Center for Animal Health*. 2017; 15: 70–81. eLIBRARY ID: 35138112. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 18.08.2022

Поступила после рецензирования / Revised 17.10.2022

Принята к публикации / Accepted 11.11.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тиманов Максим Викторович, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Тимина Анна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бiryuchenkova Марина Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Maksim V. Timanov, Leading Veterinarian, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anna M. Timina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Marina V. Biryuchenkova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.