

На правах рукописи

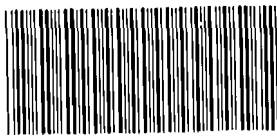


Герасимова Надежда Николаевна

**Идентификация вируса инфекционной анемии лошадей
на основе молекулярно-генетических методов**

03.02.02 Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



005555820

27 НОЯ 2014

Вольгинский – 2014

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник
(ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

**Колбасова
Ольга Львовна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
заведующая отделом
(ФГБНУ ВНИТИБП)

**Матвеева
Ирина Николаевна**

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Андрейчук
Дмитрий Борисович**

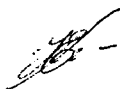
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ).

Защита диссертации состоится **«30» декабря 2014 г. в «12.00» часов** на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии по адресу: 601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, строение 1. Тел/факс: (4922) 379251.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Автореферат разослан **«14» ноября 2014 г.**, размещен на официальном сайте ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии www.vniivvim.ru и на официальном сайте ВАК России www.vak2.ed.gov.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета
ГНУ ВНИИВВиМ
Россельхозакадемии,
кандидат биологических наук



**Балашова
Елена Алексеевна**

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН, болотная лихорадка) – вирусная болезнь однокопытных, характеризующаяся поражением органов кроветворения и проявляющаяся рецидивирующей лихорадкой, анемией, тромбоцитопенией и нарушением функций сердечно-сосудистой системы [Юров, К. П., 2010; Саромассио, С., 2012; Leroux, С., 2004].

Этиологическим агентом данного заболевания является РНК-содержащий вирус семейства *Retroviridae*, подсемейства *Orthoretrovirinae*, рода *Lentivirus* [Саромассио, С., 2012; ОИЕ, 2014]. К ИНАН восприимчивы представители семейства лошадиных (*Equidae*) [Ataseven, V.S., 2005; Саромассио, С., 2012]. Переболевшие животные остаются пожизненными вирусоносителями и представляют опасность как резервуар возбудителя инфекции [Юров, К. П., 2010; Cappelli, К., 2011; Leroux, С., 2004; Quinlivan, М., 2007].

Для ИНАН характерна цикличность репродукции и антигенная изменчивость вируса, в результате чего у лошадей формируется состояние нестерильного иммунитета [Leroux, С., 2004; Salinovich, О., 1986]. Хозяйства, в которых выявлено данное заболевание, несут экономические потери, складывающиеся не только из падежа больных лошадей, но и выбраковки серопозитивных животных.

Пути передачи ИНАН многообразны и достаточно хорошо изучены. При этом следует учитывать, что основные переносчики инфекции – кровососущие насекомые [Baldacchino, F., 2014; Hawkins, J.A., 1976], встречаются в большинстве ландшафтно-географических зон России, создавая предпосылки для дальнейшего распространения вируса по территории Российской Федерации (РФ).

За период с 2011 по 2014 гг. в РФ были выявлены сероположительные на ИНАН лошади более чем в 25 субъектах [Россельхознадзор, 2014; ОИЕ, 2014].

На сегодняшний день не разработано эффективных вакцин, позволяющих предотвратить распространение данной инфекции [Cook, R.F., 2013]. Поэтому основными методами борьбы с ИНАН являются её ранняя диагностика, изоляция и выбраковка зараженных животных.

Согласно современным руководствам и инструкциям референтным методом в диагностике ИНАН является реакция диффузионной преципитации (РДП, тест Коггинса). Но, наряду с серологическими методами, МЭБ рекомендует

осуществление молекулярно-генетического контроля в случаях расхождения результатов серологических тестов, с целью выявления инфекции до начала сероконверсии и для определения инфекционного статуса жеребят, рожденных от инфицированных кобыл [ОIE, 2014]. Актуальность разработки новых средств диагностики ИНАН для РФ связана с обеспечением безопасности при импорте племенных и спортивных лошадей из стран, неблагополучных по заболеванию, так как данная болезнь широко распространена по всему миру [Cappelli, K., 2011; Dong, J.B., 2013; Pagamjav, O., 2011; OIE, 2014].

Кроме того, такие молекулярно-биологические методы, как секвенирование ДНК и проведение филогенетического анализа, позволяют определять генетические характеристики вновь выявленных изолятов вируса [Carotaccio, S., 2012; Cappelli, K., 2011; OIE, 2014].

Таким образом, неблагополучие по ИНАН многих регионов РФ, стран ближнего зарубежья и стран-экспортеров, отсутствие средств лечения и специфической профилактики обуславливают проблему раннего обнаружения данной инфекции в нашей стране, как весьма актуальную. Следует отметить, что определение молекулярно-генетических характеристик полевых изолятов вируса ИНАН, выделенных при вспышках болезни в РФ, является необходимым аспектом в изучении молекулярной эпизоотологии и эволюции вируса.

1.2 Степень разработанности проблемы

Для лабораторной диагностики ИНАН за рубежом разработаны серологические и молекулярно-генетические методы [Coggins, L., 1970; Cook, R.F., 2002; Soutullo, A., 2001]. С целью генодиагностики ИНАН предложены различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) как для обнаружения вирусной РНК, так и провирусной ДНК (пДНК). Разработаны: обратнo-транскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР) с электрофоретической детекцией, «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров на различные участки генома вируса [Cook, R.F., 2002; Nagarajan, M.M., 2001; Quinlivan, M., 2007]. Изучен нуклеотидный состав РНК и пДНК выделенных за рубежом штаммов и изолятов вируса ИНАН, проведен их филогенетический анализ [Cappelli, K., 2011; Carotaccio, S., 2012].

В Российской Федерации разработаны серологические средства лабораторной диагностики ИНАН: РДП и иммуноферментный анализ (ИФА) [Льюлькова, Л. С.,

2001]. Однако, средства для идентификации вируса ИНАН на основе молекулярно-генетических методов на момент проведения исследований в нашей стране отсутствовали. Не была дана характеристика нуклеотидного состава штамма отечественного происхождения и циркулирующих в РФ изолятов вируса, не установлены их филогенетические отношения.

1.3 Цель и задачи исследований

В соответствии с вышеизложенным, целью данных исследований являлась разработка тест-систем на основе ПЦР для выявления генома вируса ИНАН, идентификация и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса, выявленных на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) разработать тест-систему для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей на основе гнездовой ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза;

2) разработать тест-систему для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени;

3) оценить возможность использования разработанных тест-систем для лабораторной диагностики ИНАН методом ОТ-ПЦР при исследовании проб клинического и патологического материала;

4) провести скрининговые исследования на наличие вируса ИНАН на территории Российской Федерации;

5) определить молекулярно-генетические характеристики и провести филогенетический анализ штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и изолятов вируса ИНАН, выявленных на территории Российской Федерации.

1.4 Научная новизна результатов исследований

В результате проведенных исследований подобраны оригинальные олигонуклеотидные праймеры и ДНК-зонд, комплементарные фрагменту *gag*-гена вируса ИНАН, на основе которых разработана тест-система для выявления РНК и провирусной ДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Разработана тест-система для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза.

В ходе скрининговых исследований с 2012 по 2014 гг. выявлены два изолята вируса ИНАН: «Нижний Новгород-2011» и «Омск-2012». Впервые определены нуклеотидные последовательности участков *gag*-гена и молекулярно-генетические характеристики выявленных изолятов вируса ИНАН и штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ».

Впервые проведен филогенетический анализ изолятов вируса ИНАН российского происхождения. Установлено, что выявленные нами изоляты относятся к европейской генетической группе, а штамм «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» к североамериканской.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

Проанализированы нуклеотидные последовательности различных штаммов и изолятов вируса ИНАН, представленные в базе данных GenBank, что позволило определить наиболее консервативные участки генома для подбора специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда.

Разработаны «Методические положения по выявлению генома вируса болезни инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР», утвержденные академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины РАСХН Смирновым А.М. (12.12.2012 г.).

Разработаны «Методические положения по выявлению РНК и пДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ИНАН/ОТ-ПЦР РВ/*gag*», утвержденные академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины РАСХН Смирновым А.М. (25.11.2013 г.).

Разработаны инструкции и Стандарты ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии к «Тест-системе для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР» (СТО 00495549-0106-2014) и «Тест-системе для выявления РНК и пДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (СТО 00495549-0105-2014), одобренные ученым советом и утвержденные директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии 30.04.2014 г.

С помощью разработанных тест-систем на основе различных вариантов ОТ-

ПЦР в период с 2012 по 2014 гг. было исследовано 828 проб крови и сывороток крови от однокопытных, из которых было получено 9 положительных результатов.

Выявленные в ходе скрининговых исследований изоляты «Нижний Новгород-2011» и «Омск-2012» депонированы в музее вирусных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Проведен молекулярно-генетический анализ участков *gag*-гена штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и 2 изолятов вируса ИНАН, выявленных в период с 2012 по 2014 гг., и изучены их филогенетические взаимоотношения.

Нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности *gag*-гена штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и изолята «Нижний Новгород-2011» депонированы в международный банк данных GenBank (№ КМ202106 и № КМ248275).

1.6 Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов исследований подтверждена статистическими методами и комиссионными испытаниями. Акты комиссионных испытаний утверждены директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии 30.08.2012 г. и 08.07.2013 г. Статистическая обработка включала расчёты средних арифметических значений и стандартных отклонений результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Основные результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены и обсуждены на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в 2012-2014 гг., на научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине» (г. Покров, 2012 г.), в рамках заседания секции «Ветеринарной биотехнологии» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (г. Щелково, 2012 и 2013 гг.), на международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2012 г.), на 7-ом Международном конгрессе EPIZONE (г. Брюссель, Бельгия, 2013 г.), на 8-ом Международном конгрессе EPIZONE (г. Копенгаген, Дания, 2014 г.) и на 8-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (г. Москва, 2014 г.).

1.7 Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах «Ветеринария», «Ветеринария и кормление», включённых в перечень изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

1.8 Структура диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические предложения, список использованной литературы, включающий 38 отечественных и 147 иностранных источников; дополнена приложениями. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 50 рисунками. В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, её научную и практическую значимость.

1.9 Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанные тест-системы для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией и ОТ-ПЦР в режиме реального времени обладают специфичностью и высокой чувствительностью.

2. Результаты выявления генома вируса ИНАН с помощью разработанных тест-систем в образцах клинического материала на разных сроках после инфицирования и образцах патологического материала.

3. Результаты скрининговых исследований биологического материала от однокопытных животных из различных хозяйств Российской Федерации с использованием разработанных тест-систем, позволивших выявить геном вируса ИНАН.

4. Результаты определения молекулярно-генетических характеристик и филогенетического анализа штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и двух изолятов вируса ИНАН, выявленных в ходе скрининговых исследований.

1.10 Личный вклад соискателя в выполнение работы

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно с использованием собственных результатов. Основной объем представленных исследований и анализ результатов, изложенных в диссертации, проведены автором самостоятельно. Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы оказывали следующие сотрудники института: к.б.н. Барышникова Е.И., к.б.н.

Титов И.А., к.б.н. Сальников Н.И. Патоморфологические и гистологические исследования проведены совместно с сотрудниками ФГОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им. Д.К. Беляева» д.б.н., зав. кафедрой морфологии, физиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы В. В. Прониным и к.в.н., доцентом Г.В. Корневой.

Диссертационная работа выполнена в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в 2011-2014 гг.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Вирусы

В работе использовали лиофилизированный материал вируса ИНАН штамма «З-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и двух изолятов вируса ИНАН, выявленных в ходе скрининговых исследований на территории РФ: «Нижегород-2011» и «Омск-2012», а также культуральные материалы гомологичных вирусов: артрита-энцефалита коз (АЭК) штамм «75G-63», висна-маеди (ВМ) штамм «М-88» и гетерологичный вирус африканской чумы лошадей (АЧЛ) штамм «452» 8-го серотипа, полученные из лаборатории Музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

2.1.2 Образцы клинического и патологического материала

При проведении исследовательских работ использовали пробы клинического материала (кровь, сыворотка крови, мазки со слизистых оболочек ротовой, носовой полостей и влагалища), отобранного на различные сроки после инфицирования, и патологического материала (легкие, печень, почки, селезенка, сердце и лимфатические узлы) от экспериментально и естественно зараженных вирусом ИНАН лошадей. Также использовали образцы патологического материала (легкие), содержащие геном вируса аденоматоза легких овец (АЛО).

В качестве отрицательных контролей использовали пробы крови от клинически здоровых животных, а также интактные культуры клеток.

2.1.3 Животные

Для экспериментального заражения вирусом ИНАН с целью получения клинического, патологического материала и изучения характера течения инфекционного процесса использовали клинически здоровую беспородную лошадь

гнедой масти в возрасте 9 месяцев из сектора подготовки животных ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

2.1.4 Культура клеток

Первичная культура клеток лейкоцитов лошади (КЛЛ), штамм диплоидных клеток синовиальной мембраны ягненка (СМЯ), первичная культура клеток синовиальной мембраны козленка (СМК) и перевиваемая линия клеток почки африканской зелёной мартышки (CV-1), полученные из музея клеточных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

2.1.5 Плазмида и бактериальные штаммы

Конструирование рекомбинантных положительных контролей к разработанным тест-системам проводили на основе плазмидного вектора pTZ57R/T (Fermentas, Латвия). Клонирование осуществляли в генетически модифицированных клетках *E. coli* линии DH5α (Invitrogen, США).

2.2 Методы

2.2.1 Подбор праймеров и зондов

Расчет праймеров и зондов проводили с помощью программы BioEdit 7.0. и Oligo 6.0. на основе сравнения и анализа нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ИНАН, опубликованных в базе данных GenBank.

2.2.2 Выделение нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот проводили методом нуклеосорбции, предложенным R. Boom (1990) в нашей модификации, фенольно-детергентным методом, описанным P. Chomczynski и N. Sacchi (1987), и по методике, основанной на применении коммерческого реагента Trizol LS (Invitrogen, США).

2.2.3 Синтез кДНК

Для проведения этапа обратной транскрипции использовали термоциклер «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва).

Денатурацию РНК проводили при 94 °С в течение 5 мин в реакционной смеси, содержащей: 5 мкл H₂O, по 1 мкл каждого праймера (10 пмоль) и матрицу в объеме 5-8 мкл. Для проведения обратной транскрипции к смеси после денатурации добавляли раствор, состоящий из следующих компонентов: 0,5 мкл дНТФ (10 ммоль), 5 мкл 5х буферного раствора для обратной транскрипции (250 ммоль Tris-HCl pH 8,3; 375 ммоль KCl; 15 ммоль MgCl₂, 50 ммоль DTT), 0,03 мкл (200 ед.)

MMLV-ревертазы, 4,5 мкл деионизированной воды. Реакцию проводили в течение 60 мин при 42 °С.

2.2.4 Проведение гнездовой ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза

Реакцию проводили в смеси следующего состава: 5X буфер для ПЦР (Амплисенс Blue) - 5 мкл; 2 мкл смеси праймеров (10 пмоль); 0,5 мкл дНТФ (10 ммоль); 0,2 мкл Taq-полимеразы и 5 мкл кДНК (исследуемый образец); объем реакционной смеси доводили до 25 мкл деионизированной водой. Для постановки гнездового варианта ОТ-ПЦР использовали амплификаторы "Терцик-МС2" (ЗАО "НПФ ДНК-технология", Россия) и "Palm Cycler" (Corbett Research, Австралия).

2.2.5 Анализ продуктов ПЦР

Анализ продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза в 1,5 – 2,0 % агарозном геле, содержащем 0,001 % интеркалирующего красителя бромистого этидия. Электрофорез проводили, используя трис-ацетатный или трис-боратный буфер, при напряженности электрического поля 8-10 В/см в течение 20-30 минут. Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

2.2.6 Проведение ОТ-ПЦР в режиме реального времени

В работе использовали технологию гибридизационных флуоресцентных зондов – TaqMan, основанную на детекции репортерной флуоресценции при гидролизе меченого зонда.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали смесь, содержащую: 5 мкл 5x буфера для ПЦР (50 ммоль KCl, 10 ммоль трис-HCl pH 8,4, ООО «КЭмБио»), 0,5 мкл дНТФ (10 ммоль); 2 мкл смеси праймеров (10 пмоль), 0,5 мкл MgCl₂ (25 ммоль), 0,3 мкл зонда (10 пмоль), 0,2 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 8 мкл кДНК, объем реакционной смеси доводили до 25 мкл деионизированной водой. Амплификацию и детекцию репортерной флуоресценции по каналу Fam (Green) проводили в термоциклерах «IQ-5» (Bio-Rad, США) и «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралия). Результаты учитывали на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на уровне 0,02 пороговой линией (Threshold).

2.2.7 Нуклеотидное секвенирование

Выделение и очистку продуктов ПЦР из агарозного геля или реакционной смеси

осуществляли коммерческими наборами АxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Аxygen, США) и QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

Секвенирование очищенных амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием реактивов "Big Dye v. 3.1. Terminator" и "5×Sequencing buffer" (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе «Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям изготовителя. Реакцию ставили в параллелях с прямыми и обратными праймерами.

2.2.8 Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ

Для выравнивания и анализа последовательностей использовали программы BioEdit 7.0. Определение филогенетических взаимоотношений проводили с помощью алгоритма Neighbor-Joining (в том числе с добавлением метода численного ресэмплинга «бутстреп») в реализации пакета «MEGA 5,0».

2.2.9 Молекулярное клонирование продуктов ПЦР

Клонирование очищенных ПЦР-продуктов проводили с помощью набора «InsTA clone PCR cloning kit» (Fermentas, Латвия) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

Выделение плазмидной ДНК из бактериальной культуры *E.coli* осуществляли с использованием набора «Plasmid Mini kit» («Qiagen», Германия) и методом щелочного лизиса. Выделенную плазмидную ДНК проверяли методом ПЦР на наличие вставки требуемой нуклеотидной последовательности [Sambrook, J., 2001].

2.2.10 *In vitro* транскрипция

Для проведения *in vitro* транскрипции использовали набор «RiboMax Large Scale RNA Production System - T7» («Promega», США). Подготовку ДНК для *in vitro* транскрипции, очистку *in vitro* транскрибированной РНК от ДНК и анализ полученной РНК проводили согласно инструкции производителя.

2.2.11 Серологические методы

Наличие специфических антител к вирусу ИНАН в сыворотке крови животных определяли серологическими методами с использованием коммерческого набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в РДП (Щелковский биокомбинат, Россия) и тест-системы для выявления антител к вирусу инфекционной анемии лошадей непрямым иммуноферментным методом (ELISA) (ID Vet, Франция) согласно инструкции производителя.

2.2.12 Гематологические исследования

Подсчет общего количества лейкоцитов в крови осуществляли в камере Горяева, определение уровня гемоглобина - при помощи гемометра Сали [Беляков, И.М., 1975].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка тест-системы для выявления генома вируса ИНАН на основе гнездовой ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза

В связи с недостаточным оснащением ряда региональных лабораторий дорогостоящим оборудованием для проведения ПЦР в режиме реального времени на первоначальном этапе разработана тест-система для выявления генома вируса ИНАН методом ПЦР с электрофоретической детекцией.

Для выявления генома вируса ИНАН нами были использованы олигонуклеотидные праймеры, комплементарные последовательностям консервативной области *gag*-гена вируса ИНАН [Nagarajan, M.M., 2001]. В основе методики лежит использование гнездовой ПЦР. Первая (внешняя) пара праймеров (EIA Fw - EIA Rev) фланкирует на последовательности геномной РНК участок размером 610 пар нуклеотидов, а вторая (внутренняя) пара (EIA *gag* Fw - EIA *gag* Rev) - участок размером 211 пар нуклеотидов.

Затем были оптимизированы параметры постановки реакции: состав реакционной смеси, концентрации реагентов для ОТ и ПЦР, оптимальную температуру гибридизации пар специфических олигонуклеотидных праймеров и профили соответствующих реакций.

3.1.1 Конструирование рекомбинантного положительного контроля амплификации к тест-системе для выявления генома вируса ИНАН методом гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией

С целью получения положительного контроля амплификации к тест-системе для выявления генома вируса ИНАН методом гнездовой ОТ-ПЦР на основе плазмидного вектора pTZ57R/T (Fermentas, Латвия) создали рекомбинантные конструкции, несущие участок нуклеотидной последовательности *gag*-гена вируса ИНАН (штамм «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ») длиной 610 п.о. Далее рекомбинантные конструкции использовали для *in vitro* транскрипции РНК.

При постановке гнездовой ОТ-ПЦР было установлено, что РНК, полученная в ходе *in vitro* транскрипции, может быть использована в качестве положительного контроля данной реакции с этапа обратной транскрипции. *In vitro* транскрибированную РНК далее использовали для определения аналитической чувствительности данной реакции.

3.1.2 Определение характеристик тест-системы на основе гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией

Для определения аналитической специфичности разработанной тест-системы исследовали препараты нуклеиновых кислот вируса ИНАН штамм «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ», двух проб нуклеиновых кислот вируса ИНАН, выделенных из патологического материала от сероположительной на ИНАН лошади, двух проб крови, искусственно контаминированной *in vitro* транскрибированной РНК вируса ИНАН, гомо- и гетерологичных вирусов, а также пробы крови от клинически здоровой лошади.

В результате проведенных исследований установлено, что амплификация специфического фрагмента кДНК наблюдалась только в 5 заведомо положительных образцах, содержащих нуклеиновую кислоту вируса ИНАН. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов при этом получено не было (рисунок 1).

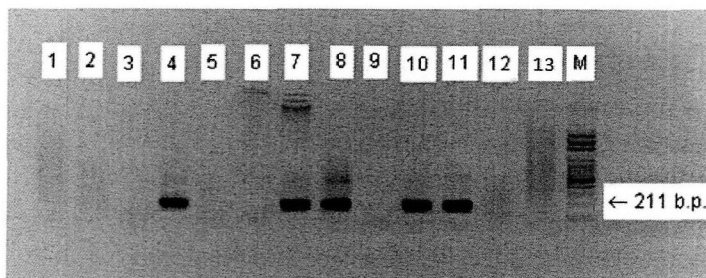


Рисунок 1 - Электрофореграмма результатов амплификации специфического фрагмента генома вируса ИНАН методом гнездовой ОТ-ПЦР: *пробы, содержащие геном вируса ИНАН*: 4 - 10% суспензия печени лошади, серопозитивной по ИНАН, 7 - 10% суспензия селезенки лошади, серопозитивной по ИНАН, 8 - вирус ИНАН, шт. «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ», 10 - кровь от клинически здоровой лошади, искусственно контаминированная *in vitro* транскрибированной РНК, синтезированной на матрице рекомбинантной плазмиды со встройкой фрагмента генома вируса ИНАН в разведении 1:1000, 11 - кровь от клинически здоровой лошади, искусственно контаминированная *in vitro* транскрибированной РНК, синтезированной на матрице рекомбинантной плазмиды со встройкой фрагмента генома вируса ИНАН в разведении 1:10; *пробы, не содержащие геном вируса ИНАН*: 1 - вирус АЭК, шт. «75G-63»; 2 - вирус ВМ, шт. «М-88», 3 - кровь козы, инфицированной вирусом АЭК шт. «75G-63», 5 - кровь от клинически здоровой лошади, 6 - 10 % суспензия легкого овцы, инфицированной АЛО, 9 - кровь овцы, инфицированной вирусом ВМ, шт. «М-88», 12 - кровь от козы, серопозитивной по АЭК и ВМ, 13 - вирус АЧЛ, штамм «452» (8 серотип); М - 100 bp ladder ДНК маркер (100 п.о.- 3000 п.о.).

Аналитическую чувствительность реакции определяли путем исследования последовательных десятикратных разведений *in vitro* транскрибированной РНК, известной концентрации, содержащей вставку фрагмента генома вируса ИНАН.

Исходная концентрация *in vitro* транскрибированной РНК, измеренная спектрофотометрически, составила 1650×10^{-6} г/мл, что соответствует $4,86 \times 10^{11}$ копиям РНК/мкл. В ходе опыта фрагмент генома вируса ИНАН был выявлен в разведениях материала от исходной концентрации до 10^{-10} . Таким образом, рассчитанное значение аналитической чувствительности гнездовой ОТ-ПЦР для выявления генома вируса ИНАН составило $4,86 \times 10^1$ (≈ 49) молекул/мкл (рисунок 2).

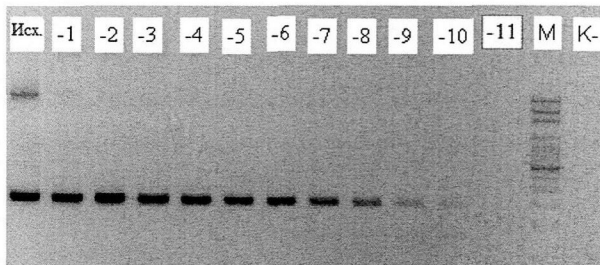


Рисунок 2 - Электрофореграмма результатов амплификации специфического фрагмента генома вируса ИНАН с помощью гнездовой ОТ-ПЦР при разных концентрациях матрицы: Исх. – *in vitro* транскрибированная РНК участка gag-гена вируса ИНАН с исходной концентрацией $4,86 \times 10^{11}$ молекул/мкл; -1 – -11 – разведения *in vitro* транскрибированной РНК от 10^{-1} до 10^{-11} ; М – 100 bp ladder ДНК маркер (100 п.о.- 3000 п.о.); К- – отрицательный контроль реакции.

С целью оценки воспроизводимости результатов обнаружения генома вируса ИНАН с помощью разработанной тест-системы тремя независимыми исследователями проведены параллельные исследования панели образцов, использованной для определения специфичности. Применение гнездовой ОТ-ПЦР позволило всем исследователям выявить 5 из 5 заведомо положительных образцов. Ложноположительные результаты при исследовании 8 заведомо отрицательных образцов отсутствовали. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов, получаемых разными исследователями при анализе образцов биоматериала на наличие генома вируса ИНАН с помощью разработанной тест-системы.

По результатам исследований создана «Тест-система для выявления генома вируса болезни инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР», которая включает в себя наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот, проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР, электрофореза, а также отрицательный и положительный контроли реакции.

На базе лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии были проведены комиссионные испытания тест-системы для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР, а также разработаны методические положения по ее применению, утверждённые академиком-секретарём отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым 12.12.2012 г.

3.2 Разработка тест-системы для выявления генома вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для выявления генома вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени подобраны оригинальные олигонуклеотидные праймеры (EIA/q2/F - EIA/q2/R), фланкирующие фрагмент *gag*-гена размером 99 п.о. и ДНК-зонд (EIA/q2/Z). Для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени выбрана технология гибридационных зондов TaqMan. В качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяли излучатель флуоресценции FAM, а в качестве тушителя флуоресценции на 3' конце - RTQ1.

После подбора специфических олигонуклеотидов оптимизировали параметры постановки реакции: состав реакционной смеси, концентрации реагентов для ОТ и ПЦР, температурные и временные профили для гибридизации пар специфических олигонуклеотидных праймеров и ДНК-зонда.

3.2.1 Конструирование рекомбинантного положительного контроля амплификации к тест-системе для выявления генома вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

С целью получения положительного контроля амплификации к тест-системе для выявления генома вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на основе плазмидного вектора рTZ57R/G (Fermentas, Латвия) создали рекомбинантную конструкцию, несущую последовательность участка *gag*-гена вируса ИНАН (штамм «З-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ») длиной 99 п.о. Далее рекомбинантная конструкция была использована для *in vitro* транскрипции РНК.

При постановке ОТ-ПЦР в режиме реального времени подтверждено, что РНК, полученная в ходе *in vitro* транскрипции, может быть использована в качестве положительного контроля данной реакции с этапа обратной транскрипции. *In vitro* транскрибированная РНК и плазмидная ДНК далее использовалась для определения аналитической чувствительности реакции.

3.2.2 Определение характеристик тест-системы на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для определения аналитической специфичности разработанной тест-системы исследовали препараты нуклеиновых кислот вируса ИНАН штамм «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ», двух проб нуклеиновых кислот вируса ИНАН, выделенных из патологического материала от сероположительной на ИНАН лошади, трёх проб крови от экспериментально зараженной вирусом ИНАН лошади, отобранных на различные сутки после заражения. Кроме того, для исследования были взяты образцы гомо- и гетерологичных вирусов, а также пробы крови от клинически здоровой лошади и интактная культура клеток (КЛЛ).

Разработанную ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали для обнаружения двух типов нуклеиновой кислоты вируса ИНАН: вирусной РНК и провирусной ДНК (пДНК).

Положительные результаты были получены только для препаратов, содержащих РНК и пДНК вируса ИНАН, тогда как для остальных исследованных проб кривые накопления флуоресцентного сигнала не превышали пороговую линию, что свидетельствует о специфичности разработанной тест – системы (рисунок 3 А и Б).

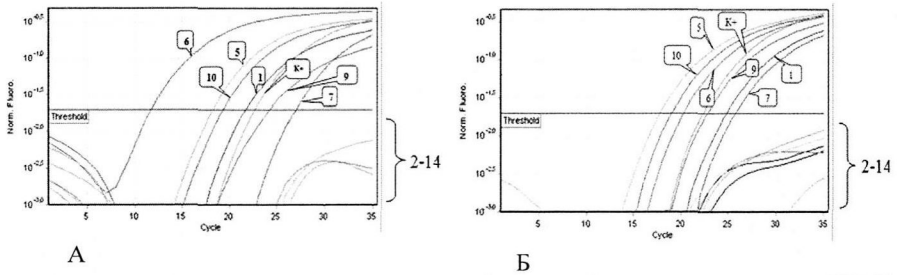


Рисунок 3 - Результаты амплификации специфического фрагмента генома вируса ИНАН с помощью метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени: А – РНК-матрица, Б – ДНК-матрица; пробы, содержащие геном вируса ИНАН: 1 - кровь от экспериментально зараженной вирусом ИНАН лошади на 35 сутки после заражения, 5 – вирус ИНАН, штамм «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ», 6 - кровь от экспериментально зараженной вирусом ИНАН лошади на 14 сутки после заражения, 7 - кровь от экспериментально зараженной вирусом ИНАН лошади на 4 сутки после заражения, 9 - 10% суспензия печени лошади, серопозитивной по ИНАН, 10 - 10% суспензия селезенки лошади, серопозитивной по ИНАН; пробы, не содержащие геном вируса ИНАН: 2 - вирус АЭК, шт. «75G-63», 3 – вирус АЧЛ, штамм «452» (8 серотип), 4 - 10 % суспензия легкого овцы с клиническими и патологическими признаками АЛЮ, 8 - интактная культура клеток лейкоцитов лошади, 11 - кровь от клинически здоровой лошади, 12 - кровь от клинически здоровой козы, искусственно контаминированная вирусом АЭК, шт. «75G-63», 13 - кровь от клинически здоровой овцы, искусственно контаминированная вирусом ВМ, шт. «М-88», 14 - вирус ВМ, шт. «М-88»; К+ - положительный контроль реакции.

С целью определения аналитической чувствительности реакции исследовали последовательные десятикратные разведения рекомбинантной конструкции с известной концентрацией, со встройкой фрагмента генома вируса, и синтезированного *in vitro* фрагмента РНК вируса ИНАН.

Исходная концентрация синтезированного *in vitro* фрагмента РНК вируса ИНАН составила $1,593 \times 10^{-6}$ г/мл, что соответствует $1,18 \times 10^9$ молекул РНК/мкл. Исходная концентрация плазмидной ДНК - $0,253 \times 10^{-6}$ г/мл и $0,77 \times 10^8$ молекул ДНК/мкл, соответственно. Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировали положительный результат.

Рассчитанное значение аналитической чувствительности ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК и пДНК вируса ИНАН составило $0,77 \times 10^2$ молекул ДНК/мкл и $1,18 \times 10^2$ молекул РНК/мкл, соответственно. (рисунки 4 и 5).

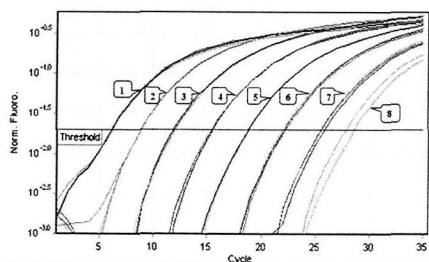


Рисунок 4 - Результаты амплификации десятикратных разведений *in vitro* транскрибированного фрагмента РНК вируса ИНАН, размером 99 п.о., с исходной концентрацией $1,18 \times 10^9$ молекул/мкл. 1-8 - разведения от исходной концентрации до 10^{-8} .

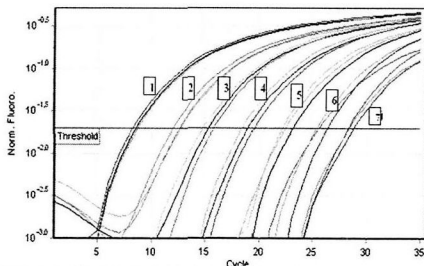


Рисунок 5 - Результаты амплификации десятикратных разведений рекомбинантной конструкции, несущей встройку фрагмента генома вируса ИНАН размером 99 п.о. с исходной концентрацией $0,77 \times 10^8$ молекул/мкл. 1-7 - разведения от исходной концентрации до 10^{-7} .

Также, определили значение эффективности амплификации фрагмента *gag*-гена вируса ИНАН, равное 99-100 % и коэффициент корреляции, составивший 0,995 - 0,999.

Для оценки воспроизводимости результатов обнаружения генома вируса ИНАН с помощью разработанной ОТ-ПЦР в режиме реального времени проведены параллельные исследования панели образцов, использованной для определения специфичности, тремя независимыми исследователями. Применение ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления генома вируса ИНАН позволило всем

исследователям выявить 6 из 6 заведомо положительных образцов. Ложноположительные результаты при исследовании отрицательных образцов отсутствовали. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов, получаемых разными исследователями при анализе образцов биоматериала на наличие генома вируса ИНАН с помощью разработанной реакции. Стандартное отклонение значения C_t варьировало в пределах 0,2 - 2,2.

По результатам проведенных исследований создана тест-система для выявления РНК и пДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ИНАН/ОТ-ПЦР РВ/gag», которая включает в себя наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот, проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР, а также отрицательный и положительный контроли реакции.

На базе лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии были проведены комиссионные испытания тест-системы для выявления РНК и пДНК вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также разработаны методические положения по ее применению, утвержденные академиком-секретарем отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым 25.11.2013 г.

3.3 Оценка возможности использования разработанных тест-систем на основе ОТ-ПЦР для лабораторной диагностики ИНАН при исследовании клинического и патологического материала от экспериментально зараженной вирусом ИНАН лошади

Следующим этапом данного исследования являлась оценка значимости разработанных тест-систем на основе гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией и ОТ-ПЦР в режиме реального времени для диагностических исследований. Изучалась возможность выявления генома вируса ИНАН в различных образцах клинического и патологического материала от экспериментально зараженной лошади.

На базе ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии проведены опыты по экспериментальному заражению восприимчивого животного вирусом ИНАН. Для заражения животного использовали 10% суспензию селезенки от серопозитивной на ИНАН лошади, вынужденно убитой во время вспышки ИНАН в Нижегородской области. Вирусосодержащий материал вводили внутривенно в объеме 10,0 мл.

В период наблюдения, составившего 35 суток, у животного отмечали признаки, характерные для ИНАН: лихорадку, анемию видимых слизистых оболочек, сильную жажду, угнетение, незначительную потерю веса. Начиная с 10 суток после инфицирования отмечалось повышение температуры тела животного выше физиологической нормы. К 15 дню после заражения температура тела составила 40,9 °С.

При гематологических исследованиях было выявлено увеличение содержания лейкоцитов в крови до начала периода подъема температуры с 7,8 тыс/мкл до 11 тыс/мкл, а затем вернулось к норме. Уровень гемоглобина, составлявший до заражения – 10 г%, во время острой стадии болезни снизился до значения – 8 г%.

При патологоанатомическом вскрытии зараженной лошади наблюдали следующие изменения органов и тканей, характерные для подострого течения ИНАН: анемию слизистых оболочек, застойную гиперемиию легких, гидроперитонеум, отек подкожной клетчатки, множественные кровоизлияния под плеврой, эпикардом и в селезенке, увеличение сердца за счет расширения правой половины, гиперплазию лимфатических узлов, полнокровие и «мускатность» печени.

При гистологическом исследовании в ткани сердца отмечали отек интерстиции, зернистую и мелкокапельную жировую дистрофию печени. Селезенка и почки - со множеством очаговых кровоизлияний, красная пульпа селезенки неравномерно полнокровна.

Отобранные в динамике инфекционного процесса образцы крови, сыворотки крови и мазков со слизистых оболочек исследовали с помощью разработанных ОТ-ПЦР тест-систем.

При исследовании крови молекулярно-генетическими методами положительный результат получили для проб, взятых на 2 сутки после заражения, как в ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией, так и в ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Далее геном вируса ИНАН выявляли в пробах крови животного с помощью обоих вариантов ПЦР до конца срока наблюдения, составившего 35 дней.

Следует отметить, что в крови были обнаружены как вирусная РНК, начиная со вторых суток, так и провирусная ДНК, начиная с четвертых суток после заражения. Обнаружение обоих типов вирусной нуклеиновой кислоты в крови, а в дальнейшем и в тканях свидетельствует о репродукции вируса в организме инфицированного животного.

При исследовании проб сывороток крови от экспериментально зараженной лошади методом ОТ-ПЦР РНК вируса ИНАН обнаруживали со 2 по 30 сутки после заражения.

Геном вируса ИНАН был выявлен также в мазках со слизистых оболочек носовой полости (с 10 по 20 сутки после заражения) и влагалища (с 10 по 25 сутки после заражения).

Во всех пробах внутренних органов – селезёнки, печени, почек, лёгких, сердца и лимфатических узлов - выявляли РНК и пДНК вируса ИНАН как в гнездовой ОТ-ПЦР, так и в ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

При исследовании сывороток крови серологическими методами обнаруживали вирусспецифические антитела: методом РДП - начиная с 30 дня после заражения, а методом непрямого ИФА - с 21 дня после заражения и до окончания срока эксперимента.

Таким образом, разработанные молекулярно-генетические методы на основе различных вариантов ПЦР позволили выявить геном вируса ИНАН в крови и сыворотке крови уже со второго дня после заражения животного, в пробах мазков со слизистых оболочек носовой полости - с 10 по 20 сутки и влагалища - с 10 по 25 сутки после заражения, а также в пробах внутренних органов зараженной лошади.

3.4 Скрининговые исследования хозяйств на наличие инфекционной анемии лошадей

Разработанные тест-системы применяли при исследовании проб клинического материала от однокопытных животных из хозяйств различных регионов РФ.

Материал от лошадей отбирали в хозяйствах Волгоградской, Нижегородской, Омской, Кировской областей, республики Бурятия и Забайкальского края. Пробы исследовали параллельно двумя разными методами: а) РДП – для выявления антител; б) ОТ-ПЦР – для выявления генома вируса ИНАН.

За период с 2012 по 2014 гг. в результате скрининговых исследований 828 проб крови и сывороток крови от однокопытных животных из различных регионов РФ с использованием «Тест-системы для выявления генома вируса болезни инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР» и тест-системы для выявления РНК и пДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ИНАН/ОТ-ПЦР РВ/gag» было выявлено 8 положительных проб, содержащих геном вируса ИНАН, из хозяйств Омской области и 1 проба - из

Нижегородской области. Методом РДП в пробах сыворотки крови от тех же 9 животных обнаружены специфические антитела к вирусу ИНАН.

Кроме того, при исследовании образцов патологического материала от сероположительной на ИНАН лошади методом ОТ-ПЦР выявлен геном возбудителя данной болезни в пробах селезенки и печени.

Таким образом, выявление по результатам РДП и ОТ-ПЦР положительно реагирующих животных свидетельствует о циркуляции вируса ИНАН в РФ. Выявленные в ходе скрининговых исследований в период с 2012 по 2014 гг. изоляты вируса ИНАН депонированы в музее вирусных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии под названиями: «Нижегород-2011» и «Омск-2012».

3.5 Секвенирование и филогенетический анализ геномов производственного штамма «ЗК-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и изолятов вируса ИНАН, выявленных на территории Российской Федерации

В связи с отсутствием данных о молекулярно-генетических свойствах изолятов, циркулирующих на территории РФ, дальнейшим этапом работы было определение нуклеотидной последовательности фрагментов генома двух изолятов и штамма вируса ИНАН отечественного происхождения.

С этой целью были определены первичные нуклеотидные последовательности фрагмента *gag*-гена пДНК производственного штамма «З-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и двух изолятов вируса ИНАН, выявленных при вспышках болезни в РФ, размером 1018 п.о. С помощью компьютерной программы «BioEdit 6.0.» проведен анализ полученных данных. При сравнении участков геномов отечественного штамма и изолятов с референтными зарубежными штаммами были выявлены множественные нуклеотидные замены.

На основании множественного выравнивания и сравнения полученных нами и размещенных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей генома вируса ИНАН, с помощью программы MEGA 5.0 по алгоритму Neighbor-Joining было построено филогенетическое древо (рисунок 6).

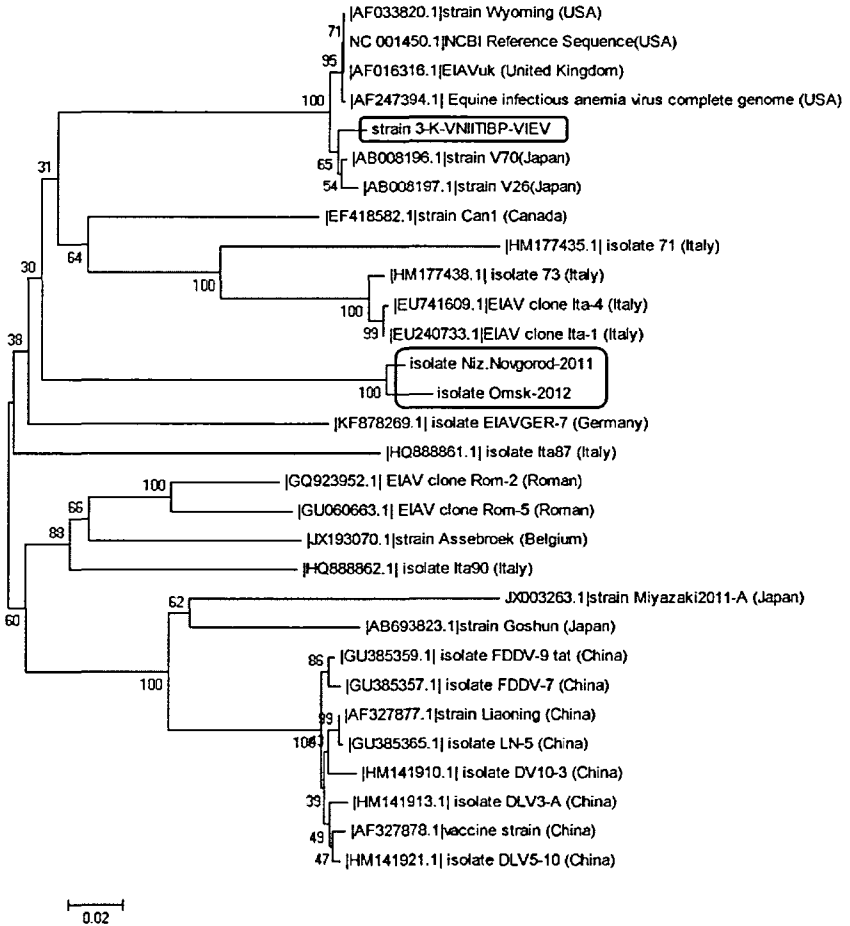


Рисунок 6 - Дендрограмма, построенная на основе анализа участков нуклеотидных последовательностей *gag*-гена различных штаммов и изолятов вируса ИНАН.

Как видно из дендрограммы, штамм вируса ИНАН «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» входит в один кластер со штаммами V70 и V26, процент гомологии – 98 %. Согласно данным литературы штаммы V70 и V26, выделенные в Японии, были получены при пассировании североамериканского штамма Вайоминг (EIAV_{WYOMING}) на естественно восприимчивых животных и входят с ним в одну генетическую группу [Dong, J., 2013; Dong, J., 2014] с уровнем внутригрупповых отличий не

превышающим 5%. Гомология нуклеотидной последовательности участка *gag*-гена штамма вируса ИНАН «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» со штаммом EIAV_{WYOMING} также составляет 98 %.

В результате филогенетического анализа установлено, что изоляты, выявленные на территории РФ в период с 2012 по 2014 гг. («Нижний Новгород-2011» и «Омск-2012»), наиболее филогенетически близки к группе изолятов европейского происхождения. При сравнении нуклеотидных последовательностей участка *gag*-гена изолятов отечественного происхождения («Нижний Новгород-2011» и «Омск-2012») с последовательностями аналогичного участка генома штаммов и изолятов вируса ИНАН, выделенных в других странах, отмечали наибольший процент гомологии с изолятами, выделенными в Германии – 83 % (isolate EIAVGER-7) и Италии – 82 % (isolate Ita87).

Нуклеотидные последовательности участка *gag*-гена производственного штамма вируса ИНАН «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» и изолята «Нижний Новгород-2011» депонированы в международный банк данных GenBank и в настоящее время являются доступными для других исследователей.

4 ВЫВОДЫ

1. Разработана тест-система для выявления генома вируса ИНАН методом гнездовой ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза, обладающая аналитической чувствительностью 49 молекул РНК/мкл.

2. Подобраны оригинальные олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие фрагмент генома, размером 99 п.о., и ДНК-зонд, комплементарные фрагменту нуклеотидной последовательности *gag*-гена вируса ИНАН.

3. Разработана тест-система для выявления генома вируса ИНАН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с аналитической чувствительностью 77 молекул ДНК/мкл и 118 молекул РНК/мкл.

4. Установлено, что с помощью разработанных тест-систем на основе ОТ-ПЦР можно выявлять геном вируса ИНАН в крови, сыворотке крови, мазках со слизистых оболочек и пробах патологического материала.

5. Данные нуклеотидного секвенирования фрагмента *gag*-гена и филогенетического анализа вируса ИНАН штамма «3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» позволяют определить его молекулярно-генетические характеристики и отнести к

группе штаммов и изолятов североамериканского происхождения. Степень нуклеотидной идентичности со штаммами V70, V26 и EIAV_{WYOMING} составляет 98%.

6. На основании данных нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа фрагментов *gag*-гена изолятов вируса ИНАН «Нижний Новгород-2011», «Омск-2012» определены их молекулярно-генетические характеристики и установлена гомология с изолятами, выделенными в Германии и Италии (степень нуклеотидной идентичности – 83%, 82%, соответственно).

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработанные тест-системы для выявления генома вируса инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР и методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ИНАН/ОТ-ПЦР *PV/gag*» предлагаются для использования в целях выявления генома вируса ИНАН в научно-исследовательских и региональных ветеринарных лабораториях.

«Методические положения по выявлению генома вируса болезни инфекционной анемии лошадей методом гнездовой ОТ-ПЦР» и «Методические положения по выявлению РНК и пДНК вируса инфекционной анемии лошадей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ИНАН/ОТ-ПЦР *PV/gag*», утвержденные академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины РАСХН Смирновым А.М. 12.12.2012 г. и 25.11.2013 г., соответственно, предлагаются для использования в научно-исследовательских и диагностических лабораториях.

Депонированные в музее вирусных штаммов изоляты «Нижний Новгород-2011» и «Омск-2012» используются в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии для научно-исследовательских работ, а нуклеотидные последовательности фрагментов генома 2 изолятов вируса ИНАН и штамма «З-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ» предлагаются для идентификации вновь выявленных изолятов, проведения филогенетического анализа и дополнения международных баз данных в молекулярной эпизоотологии.

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Герасимова, Н.Н. Инфекционная анемия лошадей: распространение и эпизоотология (обзор) / Н.Н. Герасимова, Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова // Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: материалы II конференции молодых учёных. – Покров, 2012. - С. 8-12.

2. Герасимова, Н.Н. Использование ПЦР в лабораторной диагностике инфекционной анемии лошадей / **Н.Н. Герасимова**, Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова // Ветеринария и кормление. - 2012. - № 6. - С. 51-53.
3. Герасимова, Н.Н. Конструирование рекомбинантного положительного контроля тест-системы гнездовой ОТ-ПЦР для выявления генома вируса ИНАН / **Н.Н. Герасимова**, Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IV Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2012. - С. 240-244.
4. Герасимова, Н.Н. Усовершенствование лабораторной диагностики инфекционной анемии лошадей / **Н.Н. Герасимова**, Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: материалы Международной научно-практической конференции. – Щелково, 2012. - С. 155-159.
5. Выявление генома вируса инфекционной анемии лошадей молекулярно-генетическими методами / **Н.Н. Герасимова**, Е.И. Барышникова, О.Л. Колбасова, С.Ж. Цыбанов, А.В. Луницин, Д.В. Колбасов // Ветеринария.-2013.-№ 2.-С. 56-59.
6. Герасимова, Н.Н. Использование ПЦР для обнаружения генома вируса ИНАН у экспериментально зараженного животного / **Н.Н. Герасимова**, С.А. Каторкин, О.Л. Колбасова // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2013. - С. 88-92.
7. Экспериментальное воспроизведение инфекционной анемии лошадей / **Н.Н. Герасимова**, О.Л. Колбасова, А.В. Луницин, Д.В. Колбасов, В.В. Пронин, Г.В. Корнева // Ветеринария. - 2013. - № 12. - С. 32-35.
8. Various methods for equine infectious anemia virus detection in experimentally infected animal / **N.N. Gerasimova**, O.L. Kolbasova, S.Zh. Tsybanov, A.V. Lunitsin, D.V.Kolbasov // Nothing permanent, except change: 7th Annual Meeting EPIZONE – Belgium, 2013. - P. 86.
9. Разработка ОТ-ПЦР в режиме реального времени для идентификации вируса инфекционной анемии лошадей / **Н.Н. Герасимова**, О.Л. Колбасова, С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов // Молекулярная диагностика - 2014. Сб. трудов VIII

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Т. II. - М., 2014. - С. 443-444.

10. Gerasimova, N.N. Detection and molecular characterization of equine infectious anaemia virus field isolate in the Omsk region of Russia / N.N. Gerasimova, O.L. Kolbasova, D.V. Kolbasov // 8th Annual Meeting EPIZONE – Denmark, 2014. - P. 88

7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛО – аденоматоз легких овец

АЧЛ – африканская чума лошадей

АЭК – артрит-энцефалит коз

ВМ – висна-маеди

дНТФ – дезоксирибонуклеотид трифосфаты

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

ИНАН – инфекционная анемия лошадей

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мкл – микролитр

МЭБ – Международное эпизоотическое бюро

ОТ-ПЦР – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

п.о. – пар оснований

пДНК – провирусная дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РДП – реакция диффузионной преципитации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФ – Российская Федерация

шт - штамм

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии,

пос. Вольгинский, Владимирской области.

Тираж 85 экз.