

# 1. ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ТА БІОЗАХИСТУ. ЕМЕРДЖЕНТНІ ІНФЕКЦІЇ

УДК 619:616.98-078:578.82/.83[SBV]:577.2.08:636.2/.3

DOI [10.36016/VM-2020-106-1](https://doi.org/10.36016/VM-2020-106-1)

## ЗАСТОСУВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ ХВОРОБИ ШМАЛЛЕНБЕРГ

*Лиманська О. Ю., Солодянкін О. С., Рудова Н. Г.,  
Корнєйков О. М., Герілович А. П.*

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної  
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: [olgaliman@ukr.net](mailto:olgaliman@ukr.net)*

Метою дослідження є визначення молекулярних маркерів для виявлення вірусу хвороби Шмалленберг за допомогою стандартної ПЛР з урахуванням генетичної структури збудника. Для отримання послідовностей геномних РНК вірусу використовували міжнародні бази даних GenBank, EMBL, DDBJ. Для проведення філогенетичного аналізу застосовували програму MEGA v. 4.0.2. Традиційні дендрограми були побудовані з використанням методу зв'язування найближчих сусідів. Аналіз філогенетичного дерева проводили шляхом візуальної оцінки його топології та попарних відстаней між компонентами вибірки. Множинне вирівнювання вибраних послідовностей, визначення молекулярних маркерів для виявлення вірусу хвороби Шмалленберг проводили за допомогою програми BioEdit v. 7.0.0 та модуля ClustalW MEGA 4. Підтверджено припущення щодо реасортації вірусу хвороби Шмалленберг. Установлено, що сегмент S вірусу є найбільш придатним молекулярним маркером для виявлення вірусу хвороби Шмалленберг шляхом стандартного варіанту ПЛР. Вибрана відповідна система праймерів, яка може бути надалі використана для розробки методу індикації генетичного матеріалу вірусу хвороби Шмалленберг

**Ключові слова:** молекулярний маркер, ПЛР, РНК

У сучасних умовах розвитку сільськогосподарської галузі, міжнародної торгівлі тваринами та продукцією тваринного походження однією з головних задач ветеринарної медицини нашої країни є, зокрема, забезпечення благополуччя тваринництва та птахівництва, виробництва повноцінної та безпечної продукції. Останнім часом особливе занепокоєння викликають екзотичні захворювання, які раніше не зустрічалися на території України. Крім таких небезпечних захворювань, як блютанг та африканська чума свиней, з якими фахівці ветеринарної медицини зіткнулися в останнє десятиліття, у 2011 р. в Німеччині було виявлено нове захворювання, масові випадки якого незабаром мали місце і на території Нідерландів, — хвороба Шмалленберг [1]. Збудником хвороби Шмалленберг є РНК-вміщуючий вірус роду *Orthobunyavirus* родини *Bunyaviridae*, геном якого містить три сегменти та має високий ступінь гомології з геномами вірусів Акабане, Аино та Шамонда. Найбільш спорідненими до вірусу Шмалленберг є віруси Sathuperi та Douglas серогрупи Simbu [2]. Епізоотична ситуація щодо хвороби Шмалленберг у країнах Європи є складною. Згідно публікацій Національного інституту ім. Фрідріха Леффлера (Німеччина), у федеральних землях було зареєстровано близько 1000 випадків хвороби Шмалленберг, причому більшість із них — на вівчарських фермах. Згідно інформації Міністерства сільського господарства Франції, вірус хвороби Шмалленберг виявлено у 28 провінціях країни переважно у вівчарських комплексах. У Нідерландах циркуляцію вірусу хвороби Шмалленберг було встановлено серед тварин 16 тваринницьких ферм, 97 вівчарських ферм і серед поголів'я кіз п'яти ферм. У Бельгії вірус хвороби Шмалленберг було виявлено у 165 господарствах, серед яких 135 — це вівчарські ферми. У Російській Федерації у 10 регіонах (зокрема у Курській, Белгородській, Володимирській та інших областях) було виявлено антитіла до вірусу хвороби Шмалленберг серед поголів'я ВРХ, завезеної із країн Європи [3–6].

Ураховуючи рекомендації МЕБ та аналіз оцінки ризику стосовно хвороби жуйних тварин, збудником якої є вірус хвороби Шмалленберг, розпорядженням Головного державного

інспектора ветеринарної медицини України № 15-2-23/6412 від 12.07.2012 р. ввезення з території низки країн Європи племінної великої та дрібної рогатої худоби на територію України можливе лише за умови, що худоба походить з благополучних господарств, досліджена методами імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і результати відповідних досліджень є негативними.

**Метою дослідження** було визначення молекулярних маркерів для детекції вірусу хвороби Шмалленберг шляхом стандартної ПЛР з урахуванням особливостей генетичної структури збудника.

**Матеріали та методи.** Для отримання послідовностей геномних РНК ізолятів вірусу хвороби Шмалленберг (ВХШ) та інших вірусів використовували міжнародні бази даних GenBank, EMBL, DDBJ. Для проведення філогенетичного аналізу використовували програму MEGA v. 4.0.2 [7]. Побудову традиційних дендрограм здійснювали із застосуванням дистанційно-матричного методу зв'язування найближчих сусідів (Neighbour joining). Аналіз філогенетичного дерева проводили шляхом візуальної оцінки його топології та попарних відстаней між компонентами вибірки. Множинне вирівнювання обраних послідовностей, визначення молекулярних маркерів для детекції ВХШ проводили за допомогою програми Bioedit v. 7.0.0, модулю ClustalW програми Mega 4.

**Результати досліджень.** Схожість клінічних ознак захворювань та патологічних змін, спричинених представниками роду *Orthobunyavirus*, а також високий рівень генетичної спорідненості цих вірусів обумовлює складність діагностики. Під час проведення вірусологічних і молекулярно-генетичних досліджень низкою дослідників було висловлено припущення стосовно того, що ВХШ може бути реасортантом [8–10]. Для з'ясування цього питання нами було проведено філогенетичний аналіз на основі послідовностей сегментів геномних РНК вірусів Сатупері, Шамонда, Оропуш, хвороби Акабане та хвороби Шмалленберг. Проведена оцінка топології побудованих філогенетичних дерев підтверджує висловлені припущення стосовно реасортації ВХШ, а саме: вірус хвороби Шмалленберг є реасортантом вірусів Шамонда (за L- та S-сегментами) та Сатупері (за M-сегментом). Про це свідчать і суми довжин гілок відповідних філогенетичних дерев, які відповідають кількості відмінностей, відображають можливі заміни у послідовностях, що аналізуються, є пропорційними ступеню розбіжності та еволюційній відстані. Так, наприклад, розрахована сума довжин гілок філогенетичного дерева, побудованого на основі послідовностей сегмента S геномних РНК вірусів хвороби Шмалленберг та Шамонда (рис. 1), становить 0,06279599, а для вірусів хвороби Шмалленберг і хвороби Акабане — 0,52220524 (рис. 2), що підтверджує еволюційну близькість саме вірусів хвороби Шмалленберг і Шамонда за сегментом S. Для визначення молекулярних маркерів для детекції вірусу хвороби Шмалленберг послідовності сегментів S, L, M геномних РНК збудника було проаналізовано стосовно кількості та довжини консервативних ділянок. Для сегмента S ВХШ було виявлено 5 консервативних фрагментів від 15 до 179 н. загальною довжиною 432 н., що для відомих ізолятів становить 51,5–60,7 % від довжини послідовності даного сегмента. Для сегмента L ВХШ було виявлено також 5 консервативних фрагментів від 21 до 187 н. загальною довжиною 406 н., що для відомих ізолятів становить 5,9–5,96 % від довжини послідовності даного сегмента. Для сегмента M ВХШ було виявлено 28 консервативних фрагментів від 17 до 228 н. загальною довжиною 2 239 н., що для відомих на цей час ізолятів становить 51,2–53,2 % від довжини послідовності даного сегмента. На основі отриманих результатів та аналізу літературних даних щодо детекції ВХШ із застосуванням молекулярно-генетичних методів [11–15] як потенційні молекулярні маркери для виявлення даного збудника були обрані сегменти M та S геномної РНК. Послідовності консервативних фрагментів цих сегментів було проаналізовано з метою визначення праймерів для проведення ПЛР-аналізу у стандартному форматі. При цьому було враховано низку вимог: певний інтервал для температури плавлення праймерів; певна ступінь стабільності 5'- та 3'-кінців праймерів — значення вільної енергії не повинно перевищувати - 4 ккал/моль; оптимальне значення GC-вмісту у послідовності олігонуклеотида, яке знаходиться в межах від 40 до 65 %; неможливість утворення праймерами вторинних структур. На основі отриманих даних встановлено, що найбільш придатним молекулярним маркером для детекції ВХШ шляхом стандартного варіанту ПЛР є сегмент S. На рис. 3 представлено фрагмент множинного вирівнювання послідовностей сегмента S геномних РНК ізолятів ВХШ; виділено послідовність одного з вибраних праймерів [14] довжиною 21 н. для детекції ВХШ.



**Висновки та перспективи подальших досліджень.** За результатами проведених досліджень підтверджено, що вірус хвороби Шмалленберг є реасортантом вірусів Шамонда та Сатупері. Визначено цільову мішень для детекції вірусу хвороби Шмалленберг із застосуванням молекулярно-генетичних технологій та підбрано відповідну систему праймерів, яка в подальшому може бути застосована для розробки методики індикації генетичного матеріалу ВХШ шляхом стандартного варіанту ПЛР.

### Список літератури

1. Кухаркина О. В., Борисова О. А. Болезнь Шмалленберга (обзор). *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2014. Т. 12, № 1. С. 86–102.
2. Спрыгин А. В. и др. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина. *Сельскохозяйственная биология*. 2012. № 6. С. 24–34. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2012.6.24rus>.
3. Hoffmann B. et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 2012. Vol. 18, No. 3. P. 469–472. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1803.111905>.
4. Челнокова М. И., Шутенков А. Г., Сулейманов Ф. И. Вирус Шмалленберг — потенциальная угроза скотоводству России. *Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии*. 2014. № 3. С. 23–27.
5. Абакин С. С., Красовская Т. Л., Кононов А. Н. Эпизоотическая ситуация по болезни Шмалленберга в Европе и Российской Федерации. *Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства*. 2014. Вып. 7, т. 1. С. 160–168.
6. Garcia-Bocanegra I. et al. Monitoring of Schmallenberg virus in Spanish wild artiodactyls, 2006–2015. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, No. 8. P. e0182212. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182212>.
7. Tamura K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, No. 8. P. 1596–1599. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
8. Никитина Е. Г. и др. Болезни Акабана и Шмалленберга: сходство и различия. *Сельскохозяйственная биология*. 2013. № 4. С. 48–52. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2013.4.48rus>.
9. Yanase T. et al. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Archives of Virology*. 2012. Vol. 157, No. 8. P. 1611–1616. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1341-8>.
10. Bowen M. D. et al. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somali. *Virology*. 2001. Vol. 291, No. 2. P. 185–190. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1201>.
11. Kęsik-Maliszewska J., Larska M. Detection of Schmallenberg virus RNA in bull semen in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2016. Vol. 19, No. 3. P. 655–657. DOI: <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0083>.
12. Schuz C. et al. European interlaboratory comparison of Schmallenberg virus (SBV) real-time RT-PCR detection in experimental and field samples: The method of extraction is critical for SBV RNA detection in semen. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015. Vol. 27, No. 4. P. 422–430. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638715593798>.
13. Lee J.-H. et al. Detection and differentiation of Schmallenberg, Akabane and Aino viruses by one-step multiplex reverse-transcriptase quantitative assay. *BMC Veterinary Research*. 2015. Vol. 11. P. 270–274. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0582-7>.
14. Bilk S. et al. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary Microbiology*. 2012. Vol. 159, No. 1–2. P. 236–238. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.035>.
15. Сальников Н. И. и др. Выявление генома вируса болезни Шмалленберг методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Ветеринария*. 2012. № 8. С. 57–58. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=17866940>.

### APPLICATION OF MOLECULAR TECHNOLOGIES FOR THE SCHMALLEMBERG VIRUS DETECTION

**Lymanska O. Yu., Solodianskin O. S., Rudova N. G., Kornieikov O. M., Gerilovych A. P.**

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

*The aim of the study is to determine molecular markers for the detection of Schmallenberg virus by standard PCR, taking into account the genetic structure of the pathogen. International databases GenBank, EMBL, DDBJ were used to obtain genomic RNA sequences of viruses. MEGA v. 4.0.2 was used for phylogenetic analysis. Traditional dendrograms were constructed using the Neighbor joining method. The analysis of the phylogenetic tree was performed by visual assessment of its topology and pairwise distances between the components of the sample. Multiple alignment of selected sequences, determination of molecular markers for the Schmallenberg virus detection was performed using BioEdit v. 7.0.0 and ClustalW module of MEGA 4. The assumptions regarding Schmallenberg virus reassortment have been confirmed. It has been found that the segment S of the Schmallenberg virus is the most suitable molecular marker for the Schmallenberg virus detection by the PCR standard variant. A suitable primers system which can be further used to develop a method for indicating the Schmallenberg virus genetic material has been selected*

**Keywords:** molecular marker, PCR, RNA