

*На правах рукописи*

**ПЛОТНИКОВ**

**Вадим Алексеевич**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ,  
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

03.02.02 – вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА - 2014

Работа выполнена в ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор **АЛИПЕР Тарас Иванович**

**Официальные оппоненты:**

- доктор биологических наук, профессор **ВАЛИХОВ Алексей Федорович**

- кандидат биологических наук **ЗУЕВ Юрий Владиславович**

**Ведущая организация** - Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии (ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии, г.Москва).

Защита состоится «06» октября 2014 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 208.131.01 при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава Российской Федерации по адресу: 123098, г.Москва, ул. Гамалеи, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ (123098, г.Москва, ул. Гамалеи, 16).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор медицинских наук

**Бурцева Елена Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Наиболее широко встречающийся в природе ретровирус, вызывающий неопластические заболевания домашней птицы - это вирус лейкоза птиц (ВЛП). Кроме индуцирования опухолей и негативного влияния на продуктивность птицы, ВЛП является потенциальным контаминирующим агентом живых вирусных вакцин.

Экономические потери птицефабрик, связанные с болезнью, вызываемых ВЛП, складываются из-за увеличения смертности и развития субклинической инфекции. Смертность из-за индуцирования новообразований у птиц может достигать до 20% (А. М. Fadly, 1999), а субклиническая инфекция вызывает понижающее действие на большое количество показателей производительности, таких как яйценоскость и качество яиц (J. S. Gavora, 1987; J. S. Gavora et al, 1980; N. L. Stedman et al, 1999). Совокупный эффект болезни наносит экономические потери, исчисляемые миллионами долларов ежегодно в США (L. N. Payne, 1991). В 1990-х годах бройлерные хозяйства США охватили вспышки миелоидного лейкоза, экономические потери от которых поставили под угрозу целую бройлерную отрасль птицеводства (L. N. Payne, 1998; L. N. Payne et al, 1982; L. N. Payne, 1991; N. L. Stedman et al, 1999).

На данный момент накоплено недостаточно информации о распространении ретровирусов в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации. Исследования, направленные на изучение распространения ВЛП были проведены сотрудниками НПО «НАРВАК» в 2001-2003 гг. Частота ВЛП-пораженных хозяйств составила 50% в 2001; 64,7% в 2002; более 80% в 2003. Антиген ВЛП выявлен у птицы в возрасте от 7 до 480 дней (Т. В. Гребенникова, 2003).

Кроме того, во многих вакцинах медицинского и ветеринарного применения в качестве субстрата для размножения вируса обычно используются эмбрионы кур и культуры клеток куриных фибробластов. Отсутствие периодического контроля куриных эмбрионов и клеток куриного происхождения, используемых для культивирования вирусов, может привести к контаминации

вирусами животных создаваемых вакцинных препаратов для людей. Поэтому создание эффективной и быстрой тест-системы для выявления ВЛП в различных биологических образцах является актуальной темой.

**Цель исследования:** молекулярно-генетический анализ и биологическая характеристика полевых изолятов ВЛП, циркулирующих в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации, а также разработка тест-системы ПЦР для выявления и дифференциации различных подтипов генома вируса.

**Задачи исследования:**

1. Провести широкомасштабный мониторинг наличия ВЛП и антител к нему в коммерческих птицеводческих хозяйствах РФ;
2. Разработать тест-систему для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-Д и J методом полимеразно-цепной реакции, оценить ее чувствительность и специфичность;
3. Оценить значимость разработанной тест-системы ПЦР для диагностических исследований. Разработать Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом ПЦР;
4. Получить банк полевых изолятов ВЛП, циркулирующих на территории РФ и определить их биологические свойства;
5. Провести молекулярно-генетический анализ полевых изолятов ВЛП, выделенных на территории РФ, проанализировать филогенетические отношения российских и зарубежных полевых изолятов.

**Объект исследования.** Исследование посвящено изучению вируса лейкоза птиц (ВЛП) - ретровируса, вызывающего неопластические заболевания домашней птицы. Кроме индуцирования опухолей и негативного влияния на продуктивность птицы, он является потенциальным контаминирующим агентом живых вирусных вакцин.

**Предмет исследования.** Основные результаты получены в процессе изучения распространения ВЛП в коммерческих птицеводческих хозяйствах РФ, а также исследования молекулярно-генетических и биологических свойств

полевых изолятов ВЛП, при разработке чувствительной и специфичной тест-системы ПЦР для выявления и дифференциации различных подгрупп ВЛП.

**Теоретические и методологические основы исследования.** В основу научно-квалификационного исследования легли вопросы вирусологии, молекулярной вирусологии, лабораторной диагностики ВЛП. В процессе работы применялись современные молекулярные и вирусологические методы исследования, методы лабораторной диагностики, эпидемиологические методы. Для анализа значимости выявленных закономерностей применялись современные методы оценки.

**Информационная база исследования.** В качестве информационных источников использовались научные публикации российских и зарубежных исследователей, материалы конференций, нормативные документы, инструкции к использованным в работе тест-системам, собственные результаты исследований.

**Основные научные результаты исследования, полученные лично автором.** Автор участвовал в сборе биологических образцов, выполнении исследований по молекулярной и серологической диагностике ВЛП в биологических материалах, участию в разработке и тестировании диагностической тест-системы на основе ПЦР, изучению молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов ВЛП.

Получена новая информация о распространенности лейкоза птиц в коммерческих птицеводческих хозяйствах Российской Федерации в период 2005-2011 г.г.

Проведен молекулярно-биологический анализ российских вирусных изолятов ВЛП, выделенных в 2009-2011 гг., проведено сравнение с зарубежными штаммами. Впервые проведен филогенетический анализ полевых изолятов ВЛП. Установлено, что выделенные нами отечественные изоляты ВЛП, незначительно отличаются от зарубежных.

Впервые в РФ разработана «Тест-система для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции». Тест-система предназначена для выявления и дифференциации генома ВЛП в сыворотке крови,

в образцах тканей и опухолей, полученных от птиц, а также для анализа качества эмбрионов и клеточных культур птичьего происхождения.

Положения, выносимые на защиту:

- Широкомасштабный мониторинг птицеводческих хозяйств РФ на наличие вируса лейкоза птиц (ВЛП) и антител к нему методами ИФА и ПЦР помогут выявить эпизоотическую ситуацию по распространению ВЛП и антител к нему на территории Российской Федерации;
- Разработанная «Тест-система для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции» характеризуется аналитической чувствительностью 10 копий РНК/мкл, специфичностью 100% и позволяет определять возбудителя в культуре клеток и в биологическом материале;
- Разработанная тест-система ПЦР позволяет проводить диагностику вируса птичьего лейкоза различных подгрупп, как для единичной особи, так и для группы птиц. Своевременная диагностика вируса птичьего лейкоза может существенно улучшить состояние поголовья в птицеводческих хозяйствах.
- Создание банка полевых изолятов ВЛП, выделенных на территории Российской Федерации в 2009-2011 г.г. позволит провести их биологический и молекулярно-генетический анализ;
- Филогенетический анализ первичной структуры фрагмента *envelope*-гена ВЛП показал, что выделенные нами отечественные изоляты ВЛП, незначительно отличаются от изолятов, выделенных на территории других стран, что наводит на мысль об общем предшественнике.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные при выполнении диссертации, позволили охарактеризовать эпизоотическую ситуацию по лейкозу птиц в птицеводческих хозяйствах РФ. Изолированный и охарактеризованный штамм ВЛП «2/11», представляющий подгруппу J, депонирован в государственную коллекцию вирусов Российской Федерации (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России).

Разработан и утвержден комплект нормативно-технической документации (инструкция по применению от 21.05.2009 и ТУ 9388-003-42418073-04, изв. №1 от 20.05.2009) «Тест-системы для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции». Данная тест-система может использоваться в региональных ветеринарных и медицинских диагностических лабораториях для мониторинга ВЛП. Подготовлен проект Методических рекомендаций по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции. Методические рекомендации предназначены для использования организациями, зарегистрированными в Российской Федерации, выпускающими и контролирующими медицинские, ветеринарные иммунобиологические, профилактические препараты, и специалистами научных лабораторий. Методические рекомендации находятся на рецензии в Роспотребнадзоре.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на IX международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 27-30 ноября 2008 г.), на VI Международном ветеринарном конгрессе по птицеводству (Москва, 26-29 апреля 2010), на семинарах USDA-ARS Avian disease and Oncology Laboratory (ADOL) (13 сентября 2009 г. и 20 мая 2011 г.). Материалы диссертации доложены и рассмотрены на заседаниях ученого совета ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского» в 2005-2008 г.г.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК МинОбрНауки России.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 146 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 2 гистограммами, 8 рисунками и 3 приложениями. Список литературы включает 279 источников, состоящий из 9 работ отечественных и 270 зарубежных авторов.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и изоляты вирусов ВЛП.** В работе были использованы референтные штаммы ВЛП: штамм RAV-1 - представитель ВЛП подгруппы А; штамм RAV-2 - представитель ВЛП подгруппы В; штамм RAV-49 - представитель ВЛП подгруппы С; штамм RAV-50 - представитель ВЛП подгруппы D; штамм RAV-0 - представитель ВЛП подгруппы Е; штамм ADOL-HcI - представитель ВЛП подгруппы J. Выделенные изоляты, исследованные в данной работе, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Полевые изоляты ВЛП, исследованные в данной работе

№	Изолят	Материал	Месяц/Год выделения	Регион
1	132	кровь	06/10	Липецкая область
2	346	кровь	01/10	Московская область
3	138	кровь	09/10	Ростовская область
4	130	кровь	01/10	Владимирская область
5	76	кровь	03/10	Владимирская область
6	11	кровь	06/11	Владимирская область
7	9	кровь	06/11	Владимирская область
8	7	кровь	06/11	Владимирская область
9	5	кровь	06/11	Владимирская область
10	2	кровь	06/11	Владимирская область
11	3	кровь	06/11	Владимирская область
12	8	кровь	03/11	Тульская область
13	654	кровь	11/09	Новосибирская область

**Методы. Сбор образцов.** Для изоляции и идентификации ВЛП использовалась цельная кровь или плазма.

**Выявление группоспецифического антигена р27 ВЛП в сыворотке крови кур методом ИФА.** Наличие группоспецифического антигена р27 ВЛП в

исследуемых образцах и подтверждения выделения вирусных изолятов проводили с использованием коммерческого ИФА-набора производства фирмы «Synbiotics» (Франция) по методике производителя.

**Выявление антител к вирусу лейкоза птиц подгруппы J.** Наличие антител к ВЛП подгруппы-J определяли с использованием коммерческого ИФА-набора «Avian leukosis virus subgroup J antibody test kit» («Synbiotics», Франция) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

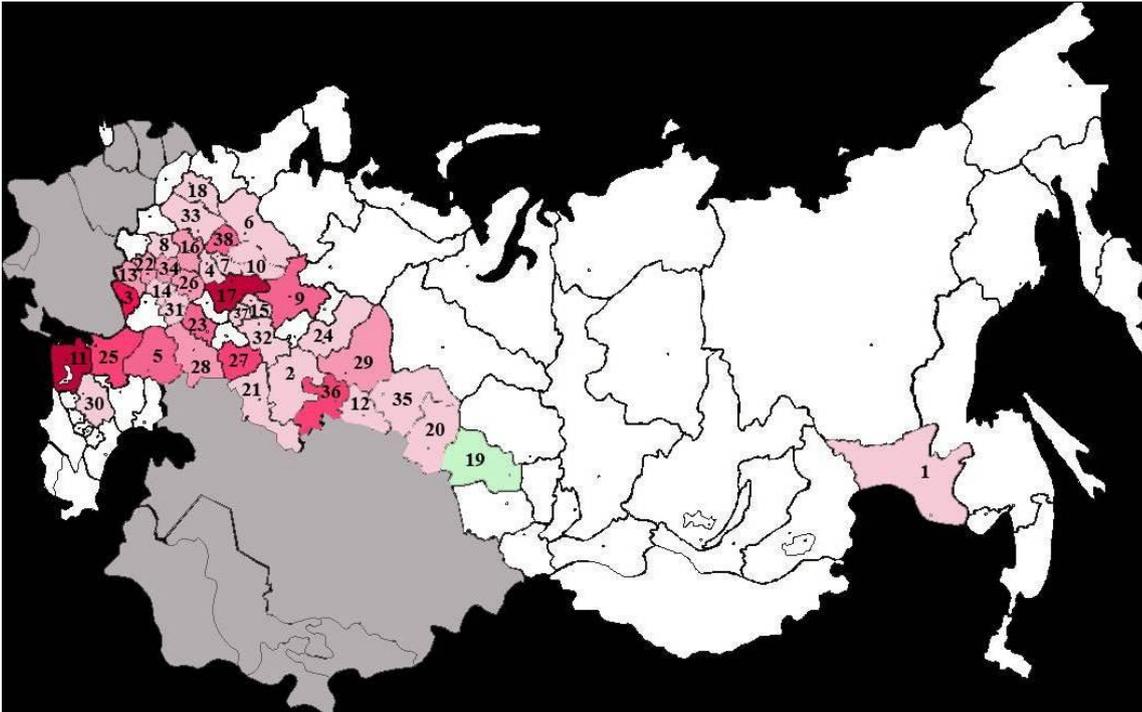
**Полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Для амплификации были использованы праймеры, специфичные к определенным участкам гена *envelope* ВЛП. Праймеры были проверены в ОТ-ПЦР на матрице РНК референтных штаммов вирусов. Затем, праймеры были использованы в ОТ-ПЦР с использованием биологических проб от птиц. ОТ-ПЦР была проведена в объеме 25 мкл. Реакционная смесь для ПЦР содержала 5 мкл суммарной РНК, 10 пмоль каждого праймера, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 1,25 ед. MMLV-ревертазы, Трис - HCl 67 mM, pH 8,8, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween-20, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Для реамплификации использовали 3 мкл ПЦР-продуктов первой реакции.

**Секвенирование амплифицированных фрагментов кДНК.** Для секвенирования амплифицированных ПЦР-фрагментов использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР. Данные секвенирования были отредактированы программным обеспечением MacVector/Assemblilign (Eastman Kodak). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Lasergene 6, MegEling («Lasergen Inc.», США) Построение филогенетической дендрограммы осуществляли на основе алгоритма Clustal W methods.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

**Мониторинг птицеводческих хозяйств на наличие ретровирусных инфекций на территории Российской Федерации.** Обследование, совместно с коллегами из ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» проводили

в 2005-2011 годах в птицеводческих хозяйствах из 47 регионов России. Было исследовано 223 хозяйства: 89 –яичного, 112 - бройлерного и 22 - племенного направлений. В ходе исследований проанализировано более 10 000 сывороток крови на содержание gs-антигена ВЛП и антител к ВЛП подгруппы J. Исследуемые регионы РФ представлены на Рис. 1.



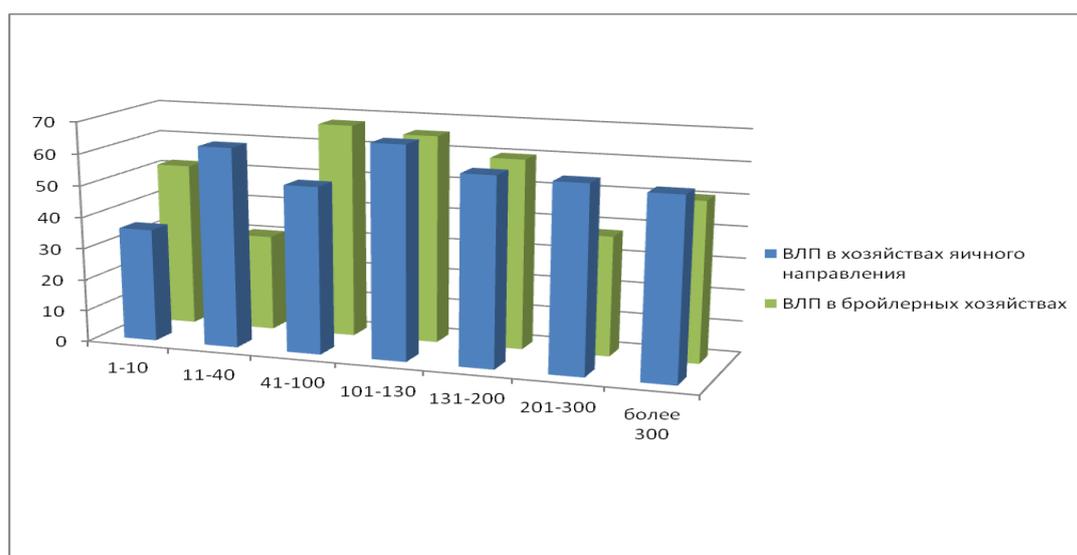
*Рис. 1. Регионы РФ, в которых проводили серомониторинг инфекции ВЛП: интенсивность окрашивания отображает количество птицеводческих хозяйств с серопозитивным поголовьем в данном регионе*

Анализ банка сывороток, собранных за период с 2005 по 2011 год, подтвердил, что практически все (97%) обследованные фабрики яичного направления (87 птицеводческих хозяйств) и более чем 50% (57 птицеводческих хозяйств) бройлерных хозяйств инфицированы ВЛП. Антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток, собранных при обследовании 70% исследованных фабрик, как яичного, так и бройлерного направления. В сыворотках, полученных из 8 хозяйств (9% от обследованных), антитела против ВЛП-J не обнаружили. Таким

образом, данные исследования указывают на широкое распространение инфекции лейкоза птиц на территории Российской Федерации.

Для анализа инфицированности птицы и наличия антител к ВЛП подгруппы J в зависимости от возраста поголовья и направления использования птицы собранные сыворотки ранжировали по семи возрастным группам для яичных и бройлерных хозяйств.

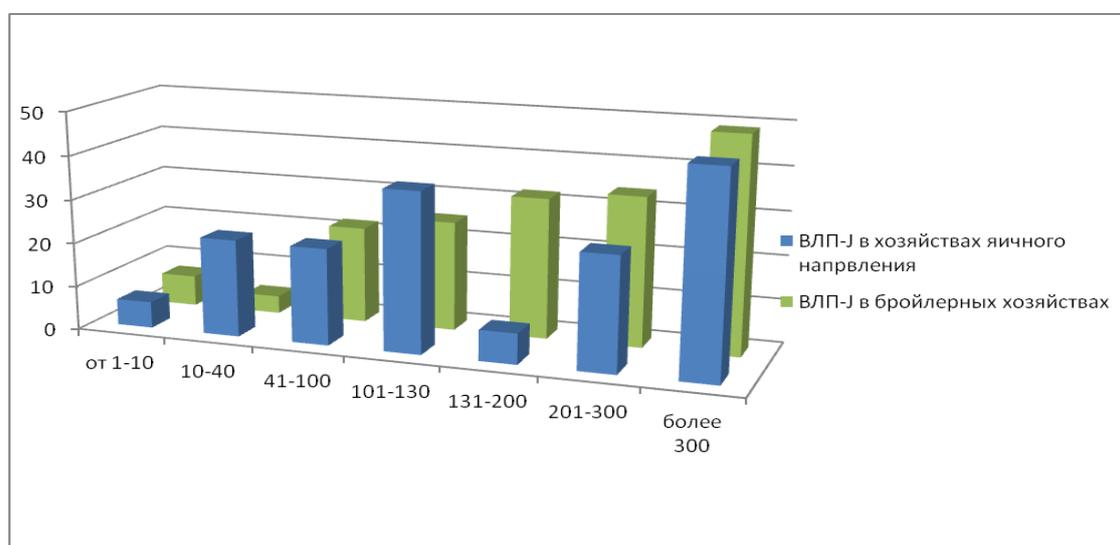
Увеличение доли положительных на gs-антиген ВЛП сывороток (Рис. 2) наблюдали до возраста 101-130 сут., далее этот показатель постепенно уменьшался до 50% уровня. Наибольший рост числа образцов, в которых детектировали ВЛП, в птицеводческих хозяйствах яичного направления отмечали в одной возрастной группе (101-130 сут. до 67 %), бройлерного — в двух группах (41-100 сут. - 68 %; 101-130 сут. - 66 %).



**Рис. 2.** Результаты исследования сывороток птиц на наличие gs-антигена ВЛП. По вертикали: процент положительных сывороток от общего числа исследованных сывороток в различных возрастных группах кур в птицефабриках яичного (синие столбцы) и бройлерного (зеленые столбцы) направлений. По горизонтали: отображены семь возрастных групп кур в днях.

Количество сывороток положительных на наличие антител против ВЛП-J (Рис. 3) у птицы из хозяйств яичного направления повышалось до 130-суточного

возраста, после чего доля серопозитивных особей резко снижалась (до 7 %) и затем достигала максимального значения (46 %) в старшей возрастной группе (более 300 сут). В бройлерных хозяйствах титр антител с возрастом птицы постоянно увеличивался. Наибольший процент сероположительных по ВЛП-*J* сывороток для обоих типов птицеводческих хозяйств отмечали в старшей возрастной группе (более 300 сут); для яичного и бройлерного направления значения составили соответственно 46 и 49 %.



**Рис. 3.** Результаты исследования сывороток на наличие антител к ВЛП подгруппы *J*. По вертикали: процент положительных сывороток от общего числа исследованных сывороток в различных возрастных группах кур в птицефабриках яичного (синие столбцы) и бройлерного (зеленые столбцы) направлений. По горизонтали: отображены семь возрастных групп кур в днях.

**Разработка метода выявления и дифференциации вируса лейкоза птиц подгрупп *A-D* и *J*.** Набор специфических праймеров был разработан и подобран на основе опубликованных первичных последовательностей геномов референтных штаммов ВЛП RAV-1, RAV-2, RSV-Pr-C, SR-RSV-D, RAV-0 и HPRS-103 (Таблица 2). Праймеры были подобраны на область гена *envelope*. При помощи компьютерной программы данные праймеры были проверены на

специфичность и универсальность со всеми известными референтными штаммами и изолятами ВЛП, нуклеотидные последовательности которых были опубликованы в Генбанке.

**Таблица 2**

Праймеры, используемые для диагностики ВЛП подгрупп А-D и J

Название праймера	Последовательность (5' → 3')
AD 1	GGG AGG TGG CTG ACT GTG T
H 5	GGA TGA GGT GAC TAA GAA AG
H 7	CGA ACC AAA GGT AAC ACA CG

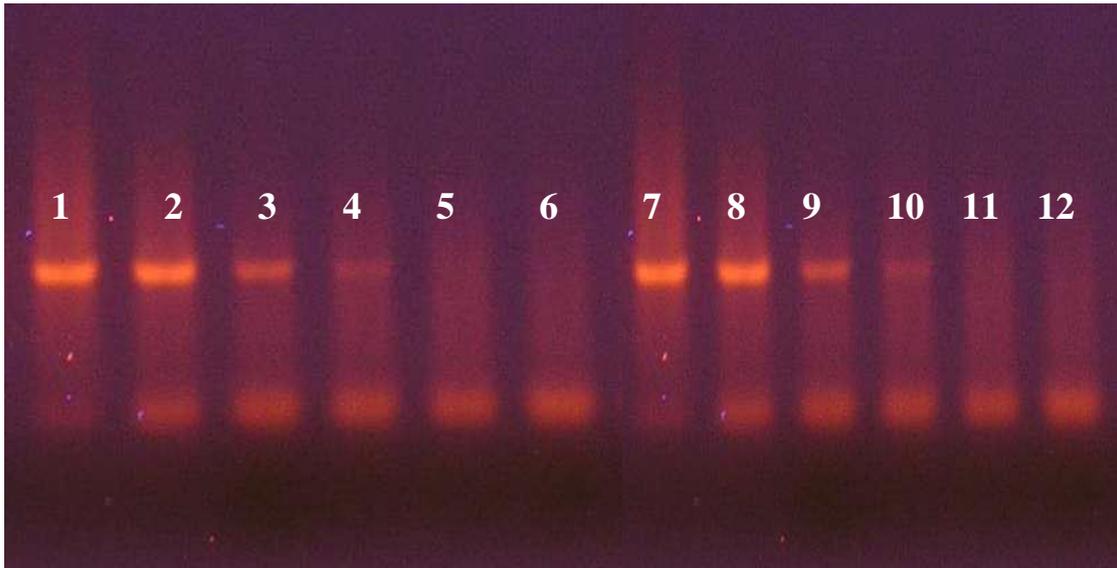
Поскольку геном ВЛП состоит из двухцепочечной РНК, а также ДНК копии, встроенной в геном птицы-хозяина, необходимо было подобрать эффективные условия для обратной транскрипции (ОТ) синтеза кДНК и ПЦР. ОТ-ПЦР проводили в одной пробирке. Был подобран следующий температурный режим (ОТ) 50°C – 45 мин., 95°C – 5 мин., (ПЦР) 95°C – 30 сек.; 51°C – 30 сек.; синтез кДНК 72°C – 45 сек.- 30 циклов.

Был сконструирован генно-инженерный положительный контроль для тест-системы по обнаружению и дифференциации ВЛП типов А-D и J с помощью диагностических праймеров: для дифференциации лейкоза птиц типов AD- H5 и AD1, для дифференциации лейкоза птиц типа J – H5 и H7.

Была проведена работа по определению возможности использования смеси плазмид и их оптимальных концентраций для проведения ОТ-ПЦР.

Проверка тест-системы показала 100% специфичность и отсутствие перекрестных реакций с другими вирусами птиц. Данная тест-система позволяет надежно дифференцировать ВЛП от других вирусов птиц.

Предел чувствительности разработанной тест-системы обнаружения РНК ВЛП составил  $10^2$  ТЦД<sub>50</sub>/мл (Рис.4).



**Рис. 4.** Обнаружение РНК ВЛП: дорожка 1 – исходный штамм ADOL Hc1 ( $10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл); дорожки 2-6 – последовательные разведения штамма ADOL Hc1 от  $10^4$  до 1 ТЦД<sub>50</sub>/мл; дорожка 7 – штамм вируса RAV-2 ( $10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/мл); дорожки 8-12 – разведения вируса RAV-2 от  $10^4$  до 1 ТЦД<sub>50</sub>/мл

Аналитическую чувствительность оценивали при тестировании серийных десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды с известным содержанием целевых копий ДНК. Аналитическая чувствительность тест-системы составила  $10^{15}$  г РНК.

Также была определена относительная чувствительность путем сравнения разработанной тест-системы ПЦР с коммерческим ИФА-набором для обнаружения группоспецифического р27-антигена («Synbiotics», Франция) (Табл. 3).

**Таблица 3****Сравнение чувствительности тест-систем ПЦР и ИФА**

ТЦД <sub>50</sub> /мл (шт. RAV-2, шт. ADOL-Hcl)	Метод	Количество дней после инокуляции КК ФЭК			
		1	2	3	7
10 <sup>4</sup>	ПЦР	+	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10 <sup>3</sup>	ПЦР	-	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10 <sup>2</sup>	ПЦР	-	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10	ПЦР	-	-	+	+
	ИФА	-	-	-	-

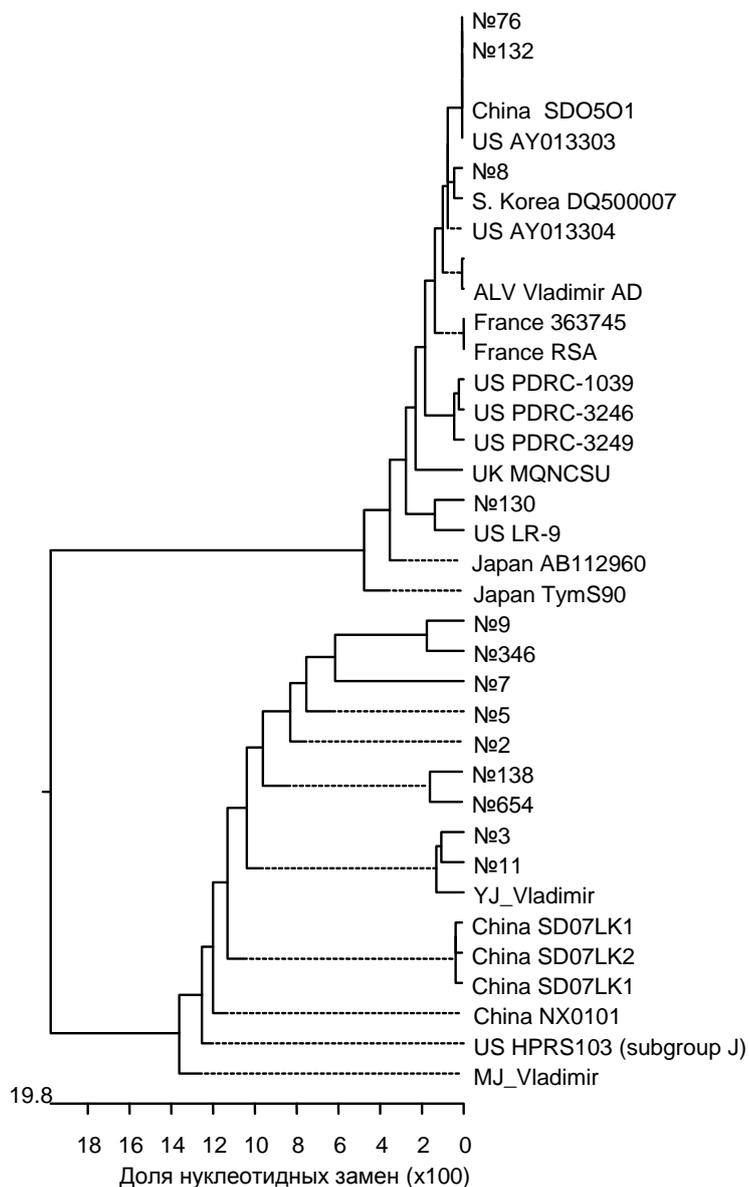
Провирусная ДНК ВЛП в КК ФЭК, инокулированных вирусом с титром инфекционности 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл и более, детектировали на второй день после инокуляции вирусом при помощи разработанной тест-системы ПЦР. Группоспецифический антиген р27 обнаруживался методом ИФА только на 7-ые сутки после инокуляции.

***Изоляция и характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории России в 2009-2011 гг.*** Из 186 исследованных проб крови удалось выделить 13 изолятов из различных областей Российской Федерации. Выделенные изоляты, время, место изоляции, а также характеристика биологических проб, из которых они были выделены, представлены в табл. 1 (см. материалы и методы).

Изоляты ВЛП размножались в КК ФЭК с титром инфекционности 4,0-6,0±0,2 ТЦП<sub>50</sub>/мл. Контаминацию вирусами БМ, ВРЭ исключили методом РИФ.

Штамм ВЛП «2/11», представляющий подгруппу J, депонирован в государственную коллекцию вирусов РФ (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России).

**Определение и сравнительный анализ первичной структуры варибельной области гена *envelope* изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на птицефабриках России в 2009-2011 гг.** Для выявления генома вируса лейкоза птиц из инокулированных культур клеток ФЭК была выделена РНК, которую использовали как матрицу в ОТ-ПЦР. В результате амплификации с системой праймеров для выявления и дифференциации вируса лейкоза А-D синтезировали вирусспецифический фрагмент кДНК размером 314 п.н. и 738 п.н. – в результате амплификации с праймерами для лейкоза J. Фрагменты в 314 и 738 нуклеотидных пар, соответствующие варибельному 5'-концевому участку гена *envelope*.



**Рис. 5.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании первичной структуры фрагмента кДНК гена *envelope* ВЛП

Анализ филогенетической дендрограммы показал (Рис. 5), что изоляты 130, 76, 132, 8, образуют с известными ранее изолятами одну генетическую группу, с уровнем внутригрупповых отличий не превышающих 5%.

Изоляты 9, 7, 2, 5, 3, 11, 138, 346 и 654 образуют вторую обширную генетическую группу с изолятами ВЛП подгруппы J, выделенных на территории Китая, Франции и США. Внутригрупповые отличия в данной группе превышают 10%.

## ВЫВОДЫ

1. Исследование птицеводческих хозяйств различных регионов Российской Федерации показало, что 97% фабрик яичного направления и более чем в 50% бройлерных хозяйств инфицированы ВЛП.

2. Антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток, собранных при обследовании 70% исследованных фабрик, как яичного, так и бройлерного направления. Наибольший процент сероположительных сывороток отмечали в старшей возрастной группе (более 300 сут); для яичного и бройлерного направления значения составили соответственно 46 и 49 %.

3. Показано, что максимальное количество образцов, в которых детектировали *gs*-антиген ВЛП, в птицеводческих хозяйствах яичного направления отмечали в возрастной группе (101-130 сут. до 67 %), а бройлерного — в двух группах (41-100 сут. - 68 %; 101-130 сут. - 66 %).

4. Показано, что разработанная тест-система для обнаружения и дифференциации ВЛП подгрупп А-D и J методом полимеразно-цепной реакции может быть использована для выявления и дифференциации различных подтипов ВЛП в птицеводческих хозяйствах РФ. Специфичность тест-системы составляет 100%, аналитическая чувствительность  $10^{-15}$  г РНК.

5. Установлено, что 13 полевых изолятов, выделенных на территории России в течение 2009-2011 гг., согласно нуклеотидной последовательности варибельной части гена *envelope*, принадлежат к различным подтипам ВЛП и формируют 2 генетические группы.

6. Методом филогенетического анализа установлено, что российские изоляты ВЛП на 5-10% нуклеотидных замен отличаются от зарубежных, что прямо указывает на один общий предшественник.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Разработана нормативно-техническая документация (инструкция по применению от 21.05.2009 и ТУ 9388-003-42418073-04, изв. №1 от 20.05.2009), утвержденная в Россельхознадзоре. Производство тест-системы передано в ООО «ВЕТБИОХИМ».
2. «Тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц подтипов AD и J» используется более 5 лет в ветеринарных региональных лабораториях.
3. Разработаны «Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции», которые находятся на рецензии в Роспотребнадзоре.
4. Создан банк данных нуклеотидных последовательностей вариабельной области гена *envelope* отечественных изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на территории РФ в 2009-2011 годах.
5. Изолированный и охарактеризованный штамм ВЛП «2/11», представляющий подгруппу J, депонирован в государственную коллекцию вирусов (ГКВ) Российской Федерации (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России) (удостоверение о депонировании в ГКВ от 09.07.2014).

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК**

1. **Плотников В.А**, Гребенникова Т.В., Южаков А. Г., Дудникова Е.К., Норкина С.Н., Забережный А. Д., Алипер Т.И., Фадли А. М. Молекулярно-генетический

анализ полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории РФ // Вопросы вирусологии. -2012, Т. 57, -№. 5. -С. 39-43.

2. **Плотников В. А.**, Гребенникова Т. В., Дудникова Е. К., Шульпин М. И., Лазарева С. П., Никонова З. Б., Меньщикова А. Э., Норкина С. Н., Алипер Т. И. О распространении вируса лейкоза птиц в птицеводческих хозяйствах на территории России.// Сельскохозяйственная биология. – 2013. - №6.- С. 36-42

### **Публикации в других изданиях**

3. **Плотников В. А.**, Алипер Т. И., Дудникова Е. К., Норкина С. Н., Гребенникова Т. В. Распространение вируса лейкоза птиц на территории Российской Федерации. // Труды IX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». – 27-30 ноября 2008 г. – С. 415.

4. **Плотников В.А.**, Гребенникова Т.В., Норкина С.Н., Дудникова Е.К., Алипер Т.И. Филогенетический анализ изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации.// Материалы VI международного ветеринарного конгресса по птицеводству, 26-29 апреля 2010 г., г. Москва, С. 44-48.

5. Гребенникова Т.В., **Плотников В.А.**, Алипер Т.И., Непоклонов Е. А. Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции. – 2013 – 17с. (на утверждении в Роспотребнадзоре).