DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-111-116

УДК 616.98:578.835

Н.И. Хаммадов

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИРУСА ЯЩУРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация

Цель работы — поиск локусов генома различных типов вируса ящура, характеризующихся наименьшей вариабельностью, для использования их в качестве генетических маркеров при ПЦР-индикации вируса. **Материалы и методы.** В работе использовались ресурсы Национального центра биотехнологической информации и программные утилиты «BLAST» и «Vector NTI 9.1.0». Для ПЦР-амплификации применялась плазмидная ДНК с маркерной вставкой. **Результаты и обсуждение.** Анализу подверглись нуклеотидные последовательности геномов вируса ящура типов *A*, *Asia-1*, *C*, *O* и *SAT* (1, 2 и 3). При выравнивании геномов изолятов каждого из типов вируса установлены потенциально консервативные участки. Сравнение этих локусов у различных типов вируса позволило выявить один максимально консервативный локус, последующий BLAST-анализ установил его высокую специфичность к геному вируса ящура, на этот локус выбрали праймеры и зонд. Кроме того, олигонуклеотидные затравки подобраны на три гена, входящих в геном крупного рогатого скота, наименее гомологичные специфичным олигонуклеотидам. Праймеры и зонд использованы в качестве внутреннего контроля амплификации. Для контроля хода амплификации разработан положительный контроль, имеющий нуклеотидную последовательность маркерной области генома вируса ящура. В геномах некоторых изолятов вируса обнаружен высокий уровень полиморфизма относительно ПЦР-зонда (у 12 изолятов по серотипам *A*, *Asia-1*, *SAT1* и *SAT2*). Устранить влияние такой вариабельности на количество выявляемых изолятов вируса позволяют модификации ПЦР-зонда (Pas FMDV и Psat FMDV). Нуклеотидные последовательности праймеров, зондов и положительного контроля представлены в таблицах.

Ключевые слова: вирус ящура, тип, штамм, полиморфизм генома, ПЦР.

Корреспондирующий автор: Хаммадов Наиль Ильдарович, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Для цитирования: Хаммадов Н.И. Генетические маркеры вируса ящура крупного рогатого скота, геномный анализ. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 2:111–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-111-116

N.I. Khammadoov

Genetic Markers of the Cattle Foot and Mouth Disease Virus: Genomic Analysis

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

Abstract. Objective of this work was to search for genome loci of various types of foot and mouth disease (FMD) virus, characterized by the lowest variability, to be used as genetic markers in the PCR-indication of the virus. **Materials and methods.** The resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and BLAST and Vector NTI 9.1.0 software utilities were employed in the research. Plasmid DNA with marker insertion was utilized for PCR amplification. **Results and discussion.** The nucleotide sequences of FMD virus genomes, the types *A*, *Asia-1*, *C*, *O* and *SAT* (1, 2 and 3), were analyzed. In the process of aligning of isolate genomes of each type, potentially conservative sites were identified. The comparison between these loci has revealed one most conserved locus, and the subsequent BLAST analysis has established its high specificity to FMD virus genome. Primers and a probe were selected for this locus. In addition, the oligonucleotide primers were selected for the three genes included in the cattle genome that are least homologous to the specific oligonucleotides. The primers/probe were used as internal control of amplification. To control the progress of amplification, a positive control has been developed that has a nucleotide sequence of the marker region of FMD virus genome. It was found out that genomes of certain virus isolates show high level of polymorphism in relation to PCR-probe (12 isolates by *A*, *Asia-1*, *SAT1*, and *SAT2* serotypes). However, modifications of the PCR-probe (Pas FMDV and Psat FMDV) allow for elimination of the effect of such variability on the number of virus isolates identification. Nucleotide sequences of the primers, probes and positive controls are presented in the tables.

Key words: Foot and mouth disease virus (FMDV), type, strain, genome polymorphism, PCR.

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

Corresponding author: Nail I. Khammadoov, e-mail: nikhammadov@mail.ru. ORCID: 0000-0001-5669-1486.

Citation: Khammadoov N.I. Genetic Markers of the Cattle Foot and Mouth Disease Virus: Genomic Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:111–116. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-111-116

Received 04.02.19. *Revised* 05.03.19. *Accepted* 13.03.19.

Вирус ящура представляет собой РНК-содержащий вирус, принадлежащий роду *Aphthovirus*, семейству *Picornaviridae*; включает серотипы: *A*, *Азия-1*, *C*, *O* и *SAT* (1, 2 и 3) [1]. Предположить на-

личие данной вирусной патологии можно при наличии изъязвлений (везикул) на слизистых оболочках языка, ротовой полости, носовом зеркале, копытах (копытцах) и вымени. Одно заболевшее животное

становится причиной быстрого заражения большого количества соседствующих животных. Вирус начинает выделяться во время инкубационного периода с выдыхаемым воздухом, молоком, мочой, калом, спермой, слюной и содержимым кожных дефектов [2, 3]. На примере данных с 2000 по 2008 год показано, что на территории доминирования вируса серотипа *O* (Непал) летальность составила от 0,6 до 2,3 % [4].

Вирус ящура патогенен более чем для 100 видов животных, которые представлены как домашним скотом, так и дикими животными [5], и представляет особую актуальность в связи с возможностью заражения человека [6]. В большинстве случаев заражение происходит при употреблении в пищу инфицированной продукции животноводства, при этом вирус попадает в организм человека через слизистые оболочки. Во время инкубационного периода, который может длиться до семи дней, происходит первичная репродукция вируса на месте его проникновения. По истечению инкубационного периода возбудитель по кровотоку распространяется по организму (губы, рот, кожа на пальцах рук и ног). В местах проникновения вируса образуются афты, которые впоследствии лопаются, образуя язвы. Проявления ящура у детей интенсивнее, у них афт гораздо больше и болевые ощущения намного сильнее, клиническая картина иногда напоминает отравление [7].

Для индикации вируса ящура активно используются серологические и молекулярно-генетические методы диагностики. Для серологической диагностики используется метод иммуноферментного анализа [8, 9]. Молекулярно-генетические методы диагностики основаны на принципах полимеразной цепной реакции, при которой в качестве маркерной последовательности не всегда применяют достаточно консервативные локусы [10, 11, 12], а публикации, в которых есть упоминания об индикации всех серотипов, не подтверждены достаточной доказательной базой и не позволяют проверить данные самостоятельно [13].

Цель исследования направлена на поиск универсальных консервативных локусов генома, имеющих у всех типов вируса ящура, для использования их в качестве генетических маркеров при ПЦР индикации вируса.

Материалы и методы

Использованная в данной работе методология биоинформационного анализа геномов различных изолятов FMDV (от foot and mouth disease virus) всех серотипов с последующим дизайном праймеров и зонда имеет общие принципы, которые используются и для других микроорганизмов [14, 15]. Нуклеотидные последовательности искомого вируса определены путем поисковых запросов баз данных ресурсов Национального центра биологической информатизации (National Center for Biotechnological Information, NCBI). Видовое (штаммовое) разнообра-

зие выявляемых организмов, с применением анализируемого генетического маркера, определено в программной утилите «nBLAST», а дизайн нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов проведен с использованием программы «Vector NTI 9.1.0» (Invitrogen Corporation). При дизайне олигонуклеотидных затравок учитывалась возможность амплификации целевых ДНК-маркеров (для индикации вируса ящура) и ДНК-маркеров внутреннего контроля амплификации (ДНК восприимчивого животного) в одной реакции.

Для ПЦР-амплификации использовалась плазмидная ДНК положительного контроля. ПЦР осуществляли на амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96 (BioRad). Методика проведения ПЦР-амплификации аналогична описанной ранее [15] со следующими модификациями: зонд для ПЦР, прямой и обратный праймеры, разработанные в рамках данной работы; температура отжига праймеров составляла 58,5 °C, детекция результата ПЦР (флуоресценции) происходила на каждом цикле ПЦР при 58,5 °C по каналам Rox и Cy5.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей различных изолятов FMDV по каждому из серотипов вируса. Для удобства ориентирования в нуклеотидной последовательности геномов различных изолятов вируса ящура серотипа *A* позиции указаны относительно изолята *Zambia/90* (GenBank ID MH053307). Для изолятов вируса ящура серотипа *Asia-1* позиции указаны относительно изолята *BAN/TA/Ma-167/2013* (GenBank ID MF782478). Для изолятов вируса ящура серотипа *C* позиции указаны относительно штамма *C-S8p200* (GenBank ID FJ824812). Для изолятов вируса ящура серотипа *O* позиции указаны относительно изолята *UGA/3/2002* (GenBank ID MH053318). Для изолятов вируса ящура серотипов *SAT* (1, 2, 3) позиции указаны относительно серотипа *SAT 3* изолята *ZIM/P27/90(DSA-31)* (GenBank ID MH053352). Позиции в нуклеотидной последовательности геномов различных серотипов вируса ящура, при анализе нуклеотидной последовательности, кодирующей фактор патогенности вируса, указаны относительно генома изолята *4235* серотипа *A* (GenBank ID JN099688). Анализ геномов всех серотипов направлен на выявление универсального, консервативного для всех серотипов вируса, имеющего минимальную вариабельность локуса, размером не более 200 bp (base pair или пар нуклеотидов), имеющегося у всех изолятов вируса.

Выявление гомологий среди различных типов вируса в пределах локуса, кодирующего фактор патогенности «VP1», направлено на определение локуса, при амплификации которого будет выявляться максимальное количество изолятов (или все изоляты) во всех серотипах вируса ящура. Данная нуклеотидная последовательность входит в состав нуклеотидной

последовательности, кодирующей вирусный капсид. Нуклеотидная последовательность локализуется в геноме вируса на участке от 2703 до 3353 bp. Каких-либо существенных гомологий в данном локусе не выявлено (гомология 40,5 %), особенно ярко выражены отличия в нуклеотидной последовательности серотипа *SAT 2*.

Дальнейший анализ направлен на выявление гомологий среди изолятов наиболее многочисленного серотипа вируса, а именно типа *O* (179 штаммов/изолятов). При анализе производился отбор последовательностей, у которых в каждой области генерации олигонуклеотидных затравок (по различным изолятам) встречается не более двух замен нуклеотидов. Первый из трех локусов, где имелась возможность произвести дизайн олигонуклеотидных затравок, локализуется на участке от 4132 до 4292 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у штамма с ID HQ412603 и изолята с ID AY593813. Второй локус локализуется на участке от 7810 до 7908 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у изолята с ID KF985189. И третий локализуется на участке от 7913 до 8043 bp, в нуклеотидной последовательности локуса существенно вариабельных штаммов/изолятов не выявлено.

Дальнейшее выявление гомологий проводилось среди следующего по многочисленности штаммов/изолятов вируса – типа *A* (117 штаммов/изолятов). Выявление гомологий проводилось по трем локусам, которые, исходя из результатов анализа вируса типа *O*, имели возможность произвести дизайн олигонуклеотидных затравок. Анализируя первый локус, который локализуется на участке от 4151 до 4310 bp, выявлен один изолят с тремя нуклеотидными заменами в области генерации обратного праймера (AY593793). Анализ второго локуса, локализованного на участке от 7829 до 7926 bp, выявил три вариабельных изолята (KC588943, KY322678, KY404934). Анализ третьего локуса, локализованного на участке от 7933 до 8061 bp, выявил один изолят (MG725874) с тремя нуклеотидными заменами в области генерации олигонуклеотидного зонда.

Выявление гомологий среди изолятов вируса типа *Asia-1* (59 штаммов/изолятов) продолжили по тем же трем локусам. Анализируя первый локус, локализованный на участке от 4162 до 4321 bp, выявили один изолят (JN006720) с тремя нуклеотидными заменами в области генерации олигонуклеотидного зонда. Второй локус, локализованный на участке от 7840 до 7937 bp, характеризовался вариабельностью трех нуклеотидов в области генерации олигонуклеотидного зонда у одного штамма (EF149009). При анализе третьего локуса, локализованного на участке от 7944 до 8072 bp, обнаружен полиморфизм в области генерации олигонуклеотидного зонда у двух изолятов вируса (DQ989310, DQ989311).

Дальнейшему анализу на выявление гомологий подвергли изоляты вируса типа *C* (23 штамма/изолята). Первый локус локализуется на участке от

4100 до 4259 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у шести изолятов вируса (AY593804, AY593810, KM268897, MH053308, MH053309, MH053310). Второй локус локализуется на участке от 7778 до 7875 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у трех изолятов вируса (AY593810, MH053308, MH053310). И третий локус локализуется на участке от 7882 до 8010 bp, в его нуклеотидной последовательности существенно вариабельных штаммов/изолятов не выявлено.

Выявление гомологий среди изолятов вируса типа *SAT* проводили сразу по всем трем вариантам (*SAT1*, *SAT2*, *SAT3*), всего 74 штамма/изолята. Первый локус локализуется на участке от 4137 до 4296 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена более чем у двадцати одного штамма/изолята вируса. Второй локус локализуется на участке от 7812 до 7909 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у двадцати трех штаммов/изолятов вируса. Третий локус локализуется на участке от 7916 до 8044 bp, при этом максимальная вариабельность отмечена у девяти изолятов вируса (FY461346, YX014255, YX014256, KC440884, MF678823, MF678824, MF678825, MF678826, MH053324). Однако критические нуклеотидные замены встречались в одних и тех же местах. Применение дополнительного зонда, с учетом трех замен, минимизирует вариабельность в нуклеотидной последовательности этих изолятов.

Таким образом, выявление гомологий среди штаммов/изолятов всех типов вируса позволило определить локус с минимальной вариабельностью. Кроме того, в ходе анализа установлены оптимальные участки для генерации олигонуклеотидных затравок, ориентация в геноме по изоляту *UGA/3/2002*, серотип *O* (GenBank ID MH053318), прямой праймер с 7913 по 7934 bp, обратный праймер с 8026 по 8043 bp и зонд в различных модификациях с 7988 по 8024 bp.

Все олигонуклеотидные затравки подвергались анализу на специфичность в программной утилите «nBLAST». В результате анализа установлена высокая специфичность анализируемых нуклеотидных последовательностей к геному вируса ящура. При более детальном анализе, исключив в параметрах поиска нуклеотидные последовательности генома вируса ящура, удалось обнаружить комплементарность прямого и обратного праймеров только к одному геному – *Triticum aestivum* (пшеница мягкая), а точнее к ее второй хромосоме (GenBank ID LS480641.1), при этом рассматривались организмы, покрытие последовательности в которых составило более 80 %. Однако амплификация генома *Triticum aestivum* с праймерами для индикации генома вируса ящура невозможна, так как в данном случае расстояние между посадкой прямого и обратного праймера составляет более 5 млн нуклеотидов. Олигонуклеотидные зонды во всех модификациях каких-либо гомологий по нуклеотидной последовательности с гетерологичными организмами не имели.

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов для ПЦР

Nucleotide sequence of primers and probes for PCR assay

Определяемый патоген / VNTR маркер Certain pathogen / VNTR marker	Обозначение праймера/зонда Designation of primer/probe	Нуклеотидная последовательность 5' → 3' Nucleotide sequence 5' → 3'
FMDV	Fp FMDV	atctccgtggcaggactcgc
	Rp FMDV	tgggtgaacgccgtgtgc
	P FMDV	Rox-ttgagattccaagctacagatcactttacctgc-BHQ2
	Pas FMDV	Rox-ttcgagataccaagctacagatcgtctacctgc-BHQ2
	Psat FMDV	Rox-ttgagatccctagctacagatcactttacctgc-BHQ2
CSN3	Fp kappa	ttggcaggcacagtatttgaca
	Rp kappa	attactaccaacagaaaccagttgca
	P kappa	Cy5-ttgaagaatttgggcaggtgacctaacgt-RTQ3
DGAT	Fp DGAT	cctctcctcaagctgtctcctac
	Rp DGAT	cctcaccagccttggcctt
	P DGAT	Cy5-acgtcaacctctggtgccgagac-RTQ3

Кроме специфичных олигонуклеотидных затравок произведен дизайн олигонуклеотидных затравок для контроля реакции амплификации, в этом случае ДНК маркерами служили гены крупного рогатого скота, а именно CSN3, кодирующий белкомолочность, и DGAT, кодирующий жирномолочность крупного рогатого скота.

В пределах представленных выше локусов для индикации генома вируса ящура и ДНК-маркеров крупного рогатого скота произведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР (табл. 1), при этом предъявлялись следующие требования: одинаковая температура плавления праймеров ($\pm 0,5$ °C); минимум димеров и вторичных структур; минимум GC на 3'-конце; для зонда – отсутствие G на 5'-конце (первый нуклеотид), а самое главное – минимальная вариабельность нуклеотидной последовательности (максимум две) в последовательности каждой олигонуклеотидной затравки.

Результат дизайна олигонуклеотидных затравок как специфических, так и для контроля амплификации представлен в табл. 1.

Таким образом, индикация всех штаммов/изолятов всех серотипов вируса ящура достигается с использованием трех модификаций олигонуклеотидного зонда. Первый зонд (P FMDV) служит для

выявления основного количества штаммов/изолятов вируса. Вторая модификация зонда (Pas FMDV) позволяет выявлять не выявленные предыдущим зондом два изолята вирусов серотипа *Asia-1*, а особенности полиморфизма девяти изолятов серотипов *SAT1* и *SAT2* и одного изолята серотипа *A* при их индикации учитывает третий зонд (Psat FMDV).

Анализ сочетаемости специфичных и контролирующих ПЦР олигонуклеотидных затравок представлен в табл. 2.

Для контроля амплификации выбран локус в рамках гена, кодирующего белкомолочность крупного рогатого скота, так как его олигонуклеотидные затравки характеризуются отсутствием гомологий с целевыми праймерами для индикации вируса ящура, и, как следствие, оказывают минимальное влияние на амплификацию со специфичными праймерами.

Разработанные праймеры для индикации вируса ящура имеют температуру плавления ($58,6 \pm 0,1$) °C, а праймеры для контроля амплификации – ($55,45 \pm 0,15$) °C, такая разница температур подразумевает более благоприятные условия амплификации специфичных праймеров (при температуре отжига 58,5 °C) и минимизирует влияние олигонуклеотидов для контроля амплификации на ход реакции.

Для контроля результата амплификации создан

Таблица 2 / Table 2

Гомология целевых олигонуклеотидов с тестовыми олигонуклеотидами для контроля амплификации

Homology of target oligonucleotides with test oligonucleotides for control of amplification process

Анализируемые олигонуклеотиды Nucleotides under study	Fp FMDV (%)	Rp FMDV (%)	P FMDV (%)	Pas FMDV (%)	Psat FMDV (%)
Fp kappa	-	-	-	-	-
Rp kappa	-	-	51,9	-	51,9
P kappa	-	-	-	-	-
Fp DGAT	-	-	-	-	-
Rp DGAT	-	-	23,2	-	-
P DGAT	-	31,3	-	-	-

Амплификация маркерного локуса для индикации вируса ящура:

A – амплификация плазмидного контроля; B – амплификация плазмидного контроля и ДНК крупного рогатого скота; C – амплификация ДНК крупного рогатого скота

Amplification of marker locus for indication of FMD virus:

A – amplification of plasmid control; B – amplification of plasmid control and cattle DNA; C – amplification of cattle DNA

положительный контроль со специфической вставкой маркерной последовательности (5'atctcgtggcag gactcgccgtccactctggacgtgacgagtagccggcgtctctttagcccttc cagggtctctttagattccaagctacagatcactttacgtgctgtgggtgaac gcctgtgc3') для индикации вируса ящура в плазмидной ДНК. Вставку маркерной последовательности в плазмиду «pAL2-T» заказали в ЗАО «Евроген». Для проверки работоспособности разработанных олигонуклеотидных затравок и плазмидного контроля амплифицировали ДНК крупного рогатого скота и плазмидного контроля с разработанными выше праймерами и зондами (специфическими и для контроля амплификации). Результат амплификации изображен на рисунке.

Амплификация с олигонуклеотидными затравками для индикации вируса ящура была результативной как в отдельной ПЦР с положительным плазмидным контролем, так и в сочетании с ДНК крупного рогатого скота. Во всех случаях в реакционной смеси присутствовали праймеры/зонды для индикации вируса и внутреннего контроля амплификации, а концентрация плазмидной ДНК составила $1 \cdot 10^8$ ДНК копий/мкл (рис. А и В). При отдельной амплификации с ДНК крупного рогатого скота перекрестных реакций с праймерами/зондами для индикации и вируса ящура не проявлялось. Индикация амплификации с олигонуклеотидными затравками для выявления вируса ящура осуществлялась по каналу Rox, а индикация внутреннего контроля амплификации осуществлялась по каналу Cy5.

Таким образом, анализ варибельности нуклеотидных последовательностей геномов различных серотипов и штаммов/изолятов внутри каждого серотипа позволил выявить locus, характеризующийся максимальной консервативностью. Однако в геномах некоторых изолятов вируса обнаружен высокий уровень полиморфизма относительно ПЦР-зонда (у 12 изолятов по серотипам A, Asia1, SAT1 и SAT2). Устранить влияние такой варибельности на количество выявляемых изолятов вируса позволяют модификации ПЦР-зонда (Pas FMDV и Psat FMDV).

Теоретическую проверку возможности специфической амплификации представленных праймеров/зондов с геномом может любой специалист в об-

ласти генетического анализа, а испытать на практике и использовать для индикации генома вируса ящура в повседневной работе могут сотрудники специализированных ПЦР-лабораторий, аттестованных для работы с вирусами II группы патогенности.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Тимина А.М., Зиняков Н.Г., Щербаков А.В., Лозовой Д.А. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, выявленных на постсоветском пространстве и в Монголии в 2016 году. *Ветеринария сегодня*. 2017; 4:3–8.
2. Мищенко А.В. Особенности клинической диагностики ящура свиней. *Ветеринария Кубани*. 2014; 2:13–4.
3. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В.Н., Кривонос Р.А., Черных О.Ю. Проблема клинической диагностики ящура у овец и коз. *Ветеринария Кубани*. 2016; 6:8–10.
4. Рамешвар Д., Паршин П.А., Сухарев О.И., Макаров В.В. Особенности эпизоотологии ящура в Непале. *Ветеринарная патология*. 2009; 4:96–104.
5. Никифоров В.В., Майорова Т.К., Караулов А.К., Спиридонов А.Н., Саввин А.В. Восприимчивость и роль диких животных при ящуре. *Ветеринария сегодня*. 2014; 1:35–40.
6. Miller R.S., Sweeney S.J., Sloomaker C., Grear D.A., Di Salvo P.A., Kiser D., Shwiff S.A. Cross-species transmission potential between wild pigs, livestock, poultry, wildlife, and humans: implications for disease risk management in North America. *Sci Rep*. 2017; 7(1):7821. DOI: 10.1038/s41598-017-07336-z.
7. Ятусевич А.И., Семенов В.М., Максимович В.В., Карасев Н.Ф., Мироненко В.М., Багрецов В.Ф. Заразные болезни, общие для животных и человека. Справочное пособие «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»; 2011. 480 с.
8. Турдиев Ш.А., Косумбеков М.И., Джумаев Ш.Н., Зуурбекова О.С., Азизбеков М., Наврузбекова М.Д. Серологические исследования ящура животных в Горно-Бадахшанской автономной области. *Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук*. 2016; 4:49–51.
9. Яковлева А.С., Каньшина А.В., Щербаков А.В., Орлова Е.С. Разработка и валидация тест-системы ЗАВ-ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыроворотках крови крупного и мелкого рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2015; 4:36–42.
10. Лозовой Д.А., Шишкова А.А., Доронин М.И., Медведева Н.Н., Тимина А.М. Применение ОТ-ПЦР-РВ для определения концентрации 146S компонента вируса ящура типов О/Саудовская Аравия и Asia-1/Shamir в полуфабрикатах вакцин. *Ветеринария*. 2017; 6:57–61.
11. Maree F.F., Blignaut B., de Beer T.A., Rieder E. Analysis of SAT Type Foot-And-Mouth Disease Virus Capsid Proteins and the Identification of Putative Amino Acid Residues Affecting Virus Stability. *PLoS One*. 2013; 8(5):e61612. DOI: 10.1371/journal.pone.0061612.
12. Yang M., Goolia M., Xu W., Bittner H., Clavijo A. Development of a quick and simple detection methodology for foot-and-mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 using a generic RapidAssay Device. *Virol. J*. 2013; 10:125. DOI: 10.1186/1743-

422X-10-125.

13. Тимина А.Н., Щербakov А.В. Определение основных характеристик ОТ-ПЦР в реальном времени, предназначенной для обнаружения вируса ящура всех серотипов. *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. 2016; 14:7–19.

14. Ндаишимийе Э.В., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н. Биоинформационный анализ олигонуклеотидов для молекулярно-генетической индикации возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел. *Ветеринарный врач*. 2015; 2:3–9.

15. Khammadova A.V., Shuralev E.A., Khammado N.I., Oumarou B.M., Faizov T.K., Mukminov M.N. Design of primers for identification of honey bee viruses in multiplex-PCR. *Astra Salvensis*. 2017; 1(5):481–90.

References

1. Timina A.M., Zinyakov N.G., Shcherbakov A.V., Lozovoy D.A. Phylogenetic analysis of FMD virus isolates detected in the post-Soviet area and in Mongolia. *Veterinariya segodnya [Veterinary Science Today]* 2017; 4:3–8.

2. Mishchenko A.V. Peculiarities of clinical diagnostics of swine foot and mouth disease. *Veterinariya Kubani [Veterinary Medicine of Kuban]*. 2014; 2:13–4.

3. Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Shevkoptyas V.N., Krivonos R.A., Chernykh O.Yu. Problems of clinical diagnostics of FMD in sheep and goats. *Veterinariya Kubani [Veterinary Medicine of Kuban]*. 2016; 6:8–10.

4. Rameshvar D., Parshin P.A., Suharev O.I., Makarov V.V. Peculiarities of foot and mouth disease epizootiology in Nepal. *Veterinarnaya patologiya [Veterinary Pathology]*. 2009; 4:96–104.

5. Nikiforov V.V., Majorova T.K., Karaulov A.K., Spiridonov A.N., Savvin A.V. Susceptibility to and the role of wild animals in foot and mouth disease. *Veterinariya segodnya [Veterinary Science Today]*. 2014; 1:35–40.

6. Miller R.S., Sweeney S.J., Sloomaker C., Grear D.A., Di Salvo P.A., Kiser D., Shwiff S.A. Cross-species transmission potential between wild pigs, livestock, poultry, wildlife, and humans: implications for disease risk management in North America. *Sci Rep*. 2017; 7(1):7821. DOI: 10.1038/s41598-017-07336-z.

7. Yatushevich A.I., Semenov V.M., Maksimovich V.V., Karasev N.F., Mironenko V.M., Bagrecov V.F. Contagious diseases, common for animals and humans. In: [Reference book “Vitebsk State Academy of veterinary medicine”]. Vitebsk; 2011. 480 p.

8. Turdiev Sh.A., Kosumbekov M.I., Dzhumayev Sh.N., Zurbekova O.S., Azizbekov M., Navruzbekova M.D. Serological studies of animal foot and mouth disease in Gorno-Badakhshansk Autonomous Region. [Reports of Tadzhik Academy of Agricultural Science]. 2016; 4(50):49–51.

9. Yakovleva A.S., Kan'shina A.V., Shcherbakov A.V., Orlova E.S. Development and validation of ZAV-EIA test-system for the detection of antibodies to non-structural proteins of FMD virus in blood sera of cattle and small ruminants. *Veterinariya segodnya [Veterinary Science Today]*. 2015; 4(15):36–42.

10. Lozovoy D.A., Shishkova A.A., Doronin M.I., Medvedeva N.N., Timina A.M. [Application of real-time RT-PCR for determination of 146S component concentration of FMD virus types O/Saudi Arabia and Asia-1/Shamir in intermediate vaccines]. *Veterinariya [Veterinary]*. 2017; 6:57–61.

11. Maree F.F., Blignaut B., de Beer T.A., Rieder E. Analysis of SAT Type Foot-And-Mouth Disease Virus Capsid Proteins and the Identification of Putative Amino Acid Residues Affecting Virus Stability. *PLoS One*. 2013; 8(5):e61612. DOI: 10.1371/journal.pone.0061612.

12. Yang M., Goolia M., Xu W., Bittner H., Clavijo A. Development of a quick and simple detection methodology for foot-and-mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 using a generic RapidAssay Device. *Virolog. J.* 2013; 10:125. DOI: 10.1186/1743-422X-10-125.

13. Timina A.N., Shcherbakov A.V. Evaluation of basic characteristics of real-time RT-PCR designed for the detection of foot and mouth disease virus of all serotypes. [Works of the Federal Center for Animal Health Protection]. 2016; 14:7–19.

14. Ndaishimije E.H.V., Hammadov N.I., Osyenin K.A., Faizov T.H., Shuralev E.A., Mukminov M.N. Bioinformation analysis of oligonucleotides for molecular-genetic indication of bee aspergillosis and ascospherosis agents. *Veterinarny vrach [Veterinary Physician]*. 2015; 2:3–9.

15. Khammadova A.V., Shuralev E.A., Khammado N.I., Oumarou B.M., Faizov T.K., Mukminov M.N. Design of primers for identification of honey bee viruses in multiplex-PCR. *Astra Salvensis*. 2017; 1(5):481–90.

Authors:

Khammado N.I. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyy Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Об авторах:

Хаммадов Н.И. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Татарстан, г. Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Поступила 04.02.18.

Отправлена на доработку 05.03.19.

Принята к публ. 13.03.19.