

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ МУЛЬТИЛОКУСНАЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ АНАЛИЗА И КОНТРОЛЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ ПОДГРУПП А, В, J и К В РОССИИ*

А.М. БОРОДИН^{1, 5}, Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{2, 3}, Н.В. КОНОВАЛОВА³,
Е.В. ТЕРЕНТЬЕВА³, Н.Ю. СЕРОВА⁴, Д.Н. ЕФИМОВ⁵, Ж.В. ЕМАНУЙЛОВА⁵,
С.В. СМОЛОВ⁵, О.А. ОГНЕВА⁵, В.И. ФИСИНИН⁶

Вирус лейкоза птиц (ВЛП) относится к роду *Alpharetrovirus* семейства *Retroviridae* и имеет диплоидный геном, состоящий из одноцепочечной РНК. Для кур специфичны вирусы подгрупп А, В, С, D, E, J и К. Классификация вируса основана на различиях в структуре белка оболочки — GP85. Инфекция ВЛП, и в особенности инфекция ВЛП подгруппы J, наносит огромный ущерб промышленному птицеводству. Золотым стандартом для выявления ВЛП считается выделение вируса в культурах клеток CEFs или DF-1. Недостаток этого метода — длительность процедуры до получения результата (7-9 сут). Наиболее широкое распространение для выявления ВЛП получил иммуноферментный анализ. В его основе лежит выявление группоспецифического антигена ВЛП p27. Однако у этого метода также есть недостатки, главные из которых — получение ложноположительных результатов из-за экспрессии p27 эндогенными вирусами и недостаточная чувствительность. При проведении настоящего исследования нами разработана тест-система для выявления наиболее распространенных в мире подгрупп ВЛП (А, В, J и К) и осуществления контроля за распространением ВЛП. Испытание тест-системы проводили на 1200 образцах ДНК бройлеров одного из птицеводческих хозяйств Московской области. Анализ образцов показал наличие ВЛП подгруппы J у 51 % поголовья, ВЛП подгруппы К — у 8 %. При этом ВЛП подгрупп А и В в проанализированной выборке не обнаружили. Также были проанализированы 97 проб ДНК от кур из регионов России — Оренбургской, Челябинской, Кемеровской, Тюменской, Калининградской, Ленинградской, Свердловской, Новгородской областей и Краснодарского края. ВЛП подгруппы К обнаружен в образцах из Калининградской, Ленинградской, Свердловской, Новгородской областей, ВЛП подгруппы А — в образцах из Ленинградской области, ВЛП подгруппы J — в Свердловской и Ленинградской областях. ВЛП подгруппы В не выявили. Это может говорить о том, что эта подгруппа ВЛП не распространена в России в настоящее время. На следующем этапе были предприняты мероприятия по эрадикации ВЛП подгрупп J и К, обнаруженных у исходных линий мясного кросса бройлерного типа в одном из хозяйств Московской области. Для этого была разработана и применена мультиплексная мультилокусная ПЦР-РВ тест-система для одновременного выявления ВЛП подгрупп J и К. С использованием предложенной тест-системы проведено несколько циклов скрининга четырех исходных линий мясного кросса кур бройлерного типа с исходной общей численностью 9029 цыплят. До начала программы эрадикации ВЛП доля птицы с неоплазиями составляла от 17 до 26 % в зависимости от линии кур (максимум наблюдался у линии с локусом *ev2l*). На 265-е сут после начала реализации программы эрадикации ВЛП подгрупп J и К было зафиксировано выбытие всего трех из 2621 особи (0,10 %) с диагнозом неоплазия, подтвержденным положительным результатом ПЦР-РВ как ВЛП подгруппы J. Всего доля особей, содержащих ДНК ВЛП подгрупп J и К, в выборке из 2621 особи в возрасте 265 сут составила соответственно 0,67 % и 0,04 %.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, ВЛП подгрупп А, В, J, К, полимеразная цепная реакция в реальном времени, выявление ВЛП.

Вирус лейкоза птиц (ВЛП) относится к роду *Alpharetrovirus* семейства *Retroviridae* и имеет диплоидный геном, состоящий из одноцепочечной РНК. Для кур специфичны вирусы подгрупп А, В, С, D, E (1), J (2) и К (3). Классификация ВЛП основана на различиях в структуре белка оболочки GP85 (2, 3). ВЛП подгрупп А, В, С, D, J и К экзогенный и распространяется горизонтально от птицы к птице или вертикально от родителей к потомкам через яйцо. Вирусы этих подгрупп имеют большую патогенность по сравнению с эндогенным вирусом подтипа E, у которого пато-

* Работа выполнена по государственному заданию № 007-01359-17-00 в рамках выполнения Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017-2025 годы, подпрограмма «Создание отечественных конкурентоспособных мясных кроссов кур бройлерного типа».

генность слабая или отсутствует. Геном эндогенных вирусов встроен в геном хозяина через инфицирование зародышевой клетки и передается генетически в соответствии с законом Менделя вертикально (1). ВЛП вызывает лимфоидный и миелоидный лейкоз и новообразования других тканей (1). Заболеваемость кур в некоторых случаях может достигать 60 %, а смертность — более 20 % (4). ВЛП подгрупп А, В, J наиболее распространен в мире, в то время как ВЛП подгрупп С и D встречается очень редко (1). В Китае с 2007 года реализуется национальная программа по искоренению ВЛП, центральное место в которой занимает борьба с ВЛП подгруппы J. Вирусы этой подгруппы представляют значительную проблему и в России, поскольку антитела к ним обнаружены в 70 % из 223 обследованных птицеводческих хозяйств в 46 регионах, а общие антитела к ВЛП — в 90 % хозяйств (5).

Золотым стандартом для обнаружения ВЛП считается выделение вируса в культурах клеток CEFs или DF-1 (1). Этот метод имеет существенные недостатки: занимает 7-9 сут, требует использования стерильных помещений и оборудования. Наиболее широкое распространение для выявления ВЛП получил иммуноферментный анализ, в основе которого лежит детекция группоспецифического антигена ВЛП р27. У этого метода также есть значительные недостатки, главные из которых — получение ложноположительных результатов из-за экспрессии р27 эндогенными вирусами (6) и недостаточная чувствительность (1, 7). Эндогенные вирусы служат причиной ложноположительных результатов и в некоторых современных тест-системах, основанных на применении полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для выявления ВЛП (6). Системы детекции ВЛП с использованием ПЦР-РВ на 15-20 % чувствительнее культурального и иммуноферментного методов (8).

В этом исследовании нами впервые предложены мультиплексные мультилокусные ПЦР-РВ тест-системы для одновременного выявления наиболее распространенных подгрупп ВЛП (А, В, J и К) и для одновременного выявления ВЛП подгрупп J и К.

Целью работы было использование разработанных тест-систем для обнаружения ВЛП и его эрадикации.

Методика. Используя программу Blast и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), подбирали консервативные участки генома ВЛП, специфичные для подгрупп А, В, J и К, которые служили мишенями для амплификации и секвенирования ДНК. При подборе специфичных участков использовали референсные последовательности из GenBank, относящиеся к разным подгруппам ВЛП: M37980, NM452341 (ВЛП-А); AF052428, JF826241 (ВЛП-В), J02342 (ВЛП-С); D10652 (ВЛП-Д); EF467236, AY013303, AY013304, KC610517 (ВЛП-Е); Z46390, JF951728, JQ935966, NM776937, JX855935, JF932002, KX058878, DQ115805, KX034517, KU997685, NM235668, NM582657 (ВЛП-J), среди которых присутствуют последовательности образцов, выделенных в разных областях России: KF746200, KR686143, GD14LZ (ВЛП-К). Праймеры и зонды для ПЦР-РВ и секвенирования по Сэнгеру были разработаны на основе опубликованных последовательностей ДНК (10, 11, 15) и синтезированы в ООО «Синтол». Праймеры и зонды подбирались так, чтобы амплифицировать ДНК ВЛП без амплификации известных эндовирусов. В качестве флуоресцентной метки в гибридационных зондах для ПЦР-РВ использовали красители 6FAM, 5R6G, 6ROX, Cy5 и Cy5.5. Гасителями флуоресценции служили красители BHQ1 и BHQ2, присоединенные через линкер к тимидину, находящемуся внутри гибрида-

ционного зонда. Для 3'-концевой модификации зонда применяли фосфатную группу (P).

ДНК выделяли из перьев кур с использованием набора реагентов М-Сорб (ООО «Синтол», Россия). Фрагмент пера длиной 0,3-0,5 см или мазок из клоаки цыплят помещали в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 400 мкл лизирующего раствора и инкубировали при 60 °С в течение 20 мин, лизат осаждали в высокоскоростной микроцентрифуге Циклотемп-902 (ЗАО «Циклотемп», Россия) в течение 1 мин при 13000 об/мин. Супернатант перенесли в пробирку объемом 1,5 мл и продолжали выделение в соответствии со стандартным протоколом к набору реагентов М-Сорб (ООО «Синтол», Россия). В полимеразной цепной реакции в реальном времени использовали 1,5 мкл выделенной ДНК.

Реакцию обратной транскрипции проводили с набором реагентов ОТ-1 (ООО «Синтол», Россия). В реакционную смесь объемом 25 мкл вносили 10 мкл препарата нуклеиновых кислот, также выделенного набором реагентов М-Сорб.

Анализ образцов методом ПЦР-РВ проводили на приборах АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) и ДТ-96 (ООО «ДНК-Технологии», Россия) по следующей программе: 90 °С — 30 с; далее денатурация при 90 °С — 10 с, отжиг при 60 °С — 30 с (50 циклов). Для амплификации ДНК использовали 10 мкл готовой 2,5× реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ М-428 (ООО «Синтол», Россия). Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 450 нМ, концентрация зондов — 100 нМ.

Специфичность ПЦР-РВ подтверждали секвенированием продуктов амплификации, полученных с праймерами ALVKF, SEQA-KR, SEQJF, SEQJR, ALVAF, SEQA-KR, на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) с программным обеспечением ДНК Анализ версия 5.0.2.3 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Результаты. Мультиплексный ПЦР-РВ анализ наиболее распространенных подгрупп вируса лейкоза птиц. Подгруппы ВЛП J, A и B — наиболее распространенные в мире. Подгруппы C и D практически не встречаются. ВЛП подгруппы K обнаружен сравнительно недавно (3, 13-16) и представляет интерес с точки зрения изучения его распространения и патогенных свойств. Даже субклиническая форма при инфицировании экзогенным и эндогенным ВЛП ведет к снижению продуктивности птицы и большим экономическим потерям (1, 17). Поэтому дизайн мультиплексной тест-системы был выполнен так, чтобы выявлять и эту подгруппу ВЛП (табл. 1). В качестве ДНК-мишени для тест-системы использовался ген белка оболочки *gp85* ВЛП соответствующих подгрупп. Положительными контролями при разработке тест-системы служили синтетические фрагменты ДНК, соответствующие расчетным амплифицируемым фрагментам генома ВЛП подгрупп A, B, J и K (см. табл. 1).

Для оценки чувствительности тест-системы использовали последовательные 10-кратные, а затем 2-кратные разведения положительных контрольных образцов. Аналитическая чувствительность тест-систем, которую определяли с разведениями положительного контроля, количество которого рассчитывали в соответствии с описанием (11, 12), составила 25 геном-эквивалентов для ВЛП подгруппы A, 10 геном-эквивалентов для ВЛП подгруппы J, 25 геном-эквивалентов для ВЛП подгруппы B и 10 геном-эквивалентов для ВЛП подгруппы K в 1 мкл исходной пробы.

1. Праймеры и зонды, использованные в мультиплексной тест-системе для выявления различных подгрупп вируса лейкоза птиц (ВЛП)

Праймеры, зонд	Последовательность (5'→3')	Длина ампликона, п.н.	Подгруппа
ALF ALR ALVPL	AGCACCCTGCTGCCTTGG CTAGCGACCGCTCCTTCCAGA (6FAM)CGATGGGACCC(dT-BHQ1)GCCCTGC-P	62	ВЛП А-Е
ALVAF ALVAR APL	GCCACACGGTTCCTCCTTAGA CGCAGTACTCACTCCCCATGAA (5R6G)TACGGTGG(dT-BHQ1)GACAGCGGATAG-P	114	ВЛП А
JFF1F JJR JNP	GCCCTGGGAAGGTGAGCAAGA GGAAATAATAACCACGCACACGA (6ROX)TCCTCTCGA(dT-BHQ2)GGCAGCAAGGGTGTC-P	139	ВЛП J
ALBF1 ALVBR BPL1G	GGCCGAGGCCTCCCGAAA GTCTCATTAATTTCTTTGATTGA (Cy5)CCCATGTACC(dT-BHQ2)CCCGTGCCTTG-P	77	ВЛП В
ALVKF ALVKR KPL	CGGAGCATTGACAAGCTTTCAGA GTGATTGCGGCGGAGGAGGA (Cy5.5)CCACCTCGTGAG(dT-BHQ2)TGCGGCC-P	72	ВЛП К

2. Праймеры и зонды, использованные в референсных тест-системах для выявления вируса лейкоза птиц (ВЛП) подгруппы J

Праймеры, зонд	Последовательность (5'→3')	Длина ампликона, п.н.	Подгруппа
ALV-JNF ALV-JNR JCP	TTGCAGGCATTCTGACTGG ACACGTTTCTGGTTGTTGC (6FAM)CCTGGGAAGGTGAGCAAGAAGGA-BHQ1	214	ВЛП J (8)
H5 H7 Probe	GGATGAGGTGACTAAGAAAG CGAACCAAAGGTAACACACG (6FAM)CTCTTTCAGGCATTCTGACTGGGC(BHQ1)	545	ВЛП J (9, 10)

Дополнительную аналитическую чувствительность системы зонда и праймеров при выявлении ВЛП подгруппы J оценивали посредством сравнения значений пороговых циклов (Ct) ПЦР-РВ с таковыми в референсных тест-системах для определения ВЛП подгруппы J (8-10) (табл. 2) с использованием ДНК изолятов ВЛП подгруппы J, выделенных в одном из птицеводческих хозяйств в Московской области. Результаты были сходными с полученными при помощи тест-системы Qin L (8), заявленная чувствительность которой менее 10 копий вируса в пробе, а ПЦР-РВ тест, основанный на применении классических праймеров H5 и H7 для определения ДНК ВЛП подтипа J (9, 10), оказался в 100 раз менее чувствительным.

Отрицательным контролем во всех постановках был 1× буфер для ПЦР, содержащий свободную от экзогенных вирусов ДНК кур. Отрицательные контроли не дали какой-либо амплификации ДНК при проведении 50 циклов ПЦР-РВ. Тест-система, использующая зонды и праймеры ALF, ALR, ALVPL (см. табл. 1) для определения всех известных подгрупп ВЛП, включая эндогенные, на аналитическую чувствительность не тестировалась и может применяться как внутренний контроль амплификации в составе мультиплексной ПЦР-РВ.

Тест-систему испытывали на выборке из 1200 образцов ДНК кур одного из птицеводческих хозяйств Московской области. Анализ показал присутствие ВЛП подгруппы J у 42 % поголовья кур и ВЛП подгруппы К — у 8 %. ВЛП подгрупп А и В в исследованной выборке не обнаружили. Кроме этого, проанализировали 97 проб ДНК, выделенной из биоматериала от птицы из ряда регионов России — Оренбургской, Челябинской, Кемеровской, Тюменской, Калининградской, Ленинградской, Свердловской, Новгородской областей и Краснодарского края. ВЛП подгруппы К

обнаружили в 3 образцах из Калининградской области, 2 образцах из Ленинградской области, 5 образцах из Свердловской области, 1 образце из Новгородской области, ВЛП подгруппы А — в 7 образцах из Ленинградской области, ВЛП подгруппы J — в 3 образцах из Свердловской и 5 образцах из Ленинградской областей. ВЛП подгруппы В не выявили, то есть можно говорить о том, что ВЛП подгруппы В не распространен в России в настоящее время. Часть положительных проб секвенировали с праймерами, приведенными в таблице 3, что подтвердило специфичность тест-системы для определения ВЛП подгрупп А, J и К.

3. Праймеры для ПЦР и секвенирования фрагментов гена *gp85* вируса лейкоза птиц (ВЛП) различных подгрупп

Праймеры	Последовательность (5'→3')	Длина ампликона, п.н.	Подгруппа
ALVAF SEQA-KR	GCCACACGGTTCCTCCTTAGA CGCGATCCCCACAAATGAGGAAA	443	ВЛП А
SEQJF SEQJR	CCCTGGGAAGGTGAGCAAGAA CCTTTATAGCACACCGAACCAGAA	498	ВЛП J
ALBF1 SEQA-KR	GGCCGAGGCCTCCCCGAAA CGCGATCCCCACAAATGAGGAAA	253	ВЛП В
ALVKF SEQA-KR	CGGAGCATTGACAAGCTTTCAGA CGCGATCCCCACAAATGAGGAAA	466	ВЛП К

Примечание. Ампликоны представляют собой фрагменты гена *gp85*, кодирующего белок оболочки вируса GP85.

Мультиплексная мультилокусная ПЦР-РВ тест-система одновременного выявления ВЛП подгрупп J и К для эрадикации вируса. Целью разработки тест-системы была эрадикация ВЛП подгрупп J и К, обнаруженных в линиях бройлеров одного из хозяйств Московской области. Метод ПЦР-РВ демонстрирует лучшую чувствительность и технологичность в сравнении с другими методами, применяемыми для обнаружения и эрадикации вируса лейкоза птиц (8). Полное искоренение вируса представляет собой сложную задачу и требует интенсивной программы тестирования. Вертикальная передача ВЛП может осуществляться в отсутствие детектируемого *gs*-антигена у кур (1). Контроль инфекции в одних линиях может быть более трудным, чем в других. Наличие локуса *ev21*, содержащего эндогенный вирус, затрудняет эрадикацию ВЛП, делая цыплят более восприимчивыми к инфекции (18). Предрасположенность птенцов мясного кросса бройлерного типа к развитию виремии после заражения ВЛП подгруппы J также способна стать препятствием для эрадикации ВЛП (1). Одно из самых существенных затруднений при осуществлении контроля за распространением вируса — чрезвычайная вариабельность наиболее распространенного и патогенного ВЛП подгруппы J (1, 2). Вариабельность последовательностей гена белка оболочки *gp85* подгруппы J вируса лейкоза птиц, выделенного из разных органов одного организма, может составлять 94,9 % (19). Различие в аминокислотных последовательностях белка оболочки между наиболее удаленными изолятами составляет 86,2 % (20).

4. Праймеры и зонды мультиплексной мультилокусной ПЦР-РВ тест-системы для одновременного выявления вируса лейкоза птиц (ВЛП) подгрупп J и К

Праймеры	Последовательность (5'→3')	Длина ампликона, п.н.	Подгруппа
ALVKF ALVKR KPL	CGGAGCATTGACAAGCTTTCAGA GTGATTGCGGCGGAGGAGGA (6FAM)CCACCTCGTGAG(dT-BHQ1)TGCGGCC-P	72	ВЛП К (ген <i>gp85</i>)
JFF1F JJR JJPLN JNP	GCCCTGGGAAGGTGAGCAAGA GGAAATAATAACCACGCACACGA (ROX)CAGCAAGGGTG(dT-BHQ2)CTTCTCCG-P (ROX)TCCTCTCGA(dT-BHQ2)GGCAGCAAGGGGTGTC-P	139	ВЛП J локус 1 (ген <i>gp85</i>)

Для повышения надежности выявления ВЛП подгруппы J была разработана ПЦР-РВ тест-система с дополнительным зондом JJPLN для гена *gp85*, кодирующего белок оболочки вируса, а также зондом JEP для фрагмента длинного концевого повтора (LTR) в геноме ВЛП подгруппы J (табл. 4). Использование такой тест-системы повысило выявляемость ВЛП подгруппы J на 2,3 % по сравнению с описанной выше тест-системой.

Стратегия мультилокусной ПЦР-РВ с использованием дополнительных зондов может также применяться для выявления ретровирусов, коронавирусов и других микроорганизмов, обладающих значительной вариабельностью генома. Материалом для обнаружения ВЛП подгрупп J и K на первом этапе программы служил мазок из клоаки 1-суточных цыплят. Для всех последующих циклов исследования в качестве биоматериала использовали пулюпу пера, которая содержит значительно большее количество вируса, чем плазма крови и другие ткани. Кроме того, в пулюпе пера ВЛП персистирует дольше, чем в плазме крови кур (21). Процедура выделения ДНК из пулюпы пера (в отличие от часто применяемого выделения ДНК из крови птицы) — неинвазивный и нетрудоемкий способ получить большее количество ДНК, в препарате которой не содержатся ингибиторы ПЦР. Для асептического отбора образцов крови необходимы стерильные пробирки и иглы для каждой курицы, а при использовании перьев — только перчатки и микроцентрифужные пробирки (22). При исследовании птицы на наличие вируса Марека и ВЛП подгруппы J выделение ДНК из пулюпы перьев давало лучшие результаты ПЦР, чем при выделении ДНК из селезенки (23).

После проникновения ВЛП в клетку из капсида высвобождаются обратная транскриптаза, две копии одноцепочечного генома ретровируса и происходит образование двухцепочечного ДНК интермедиата, который при помощи интегразы может встраиваться в геном клетки-хозяина (24). Эта форма вируса, как и другие формы, соответствующие разным стадиям развития ретровируса, могут быть выявлены при помощи метода ПЦР-РВ (25). Поэтому говорить только о детекции провируса, если не проводится обратная транскрипция, было бы не совсем корректно. Применение технологий выявления нуклеиновых кислот вместо вирусных антигенов в случае вируса лейкоза птиц дает возможность выбраковки особей с временно неактивным провирусом, снижая таким образом персистенцию вируса в стаде. Стресс — один из факторов, приводящих к реактивации инфекционного процесса (26). Мы сравнивали аналитическую чувствительность тест-системы ПЦР-РВ с проведением обратной транскрипции и без нее. Было обнаружено увеличение чувствительности выявления ВЛП подгруппы J и K до двух порядков с применением обратной транскрипции в тканях с активным инфекционным процессом. Это дает дополнительные возможности повышения аналитической чувствительности выявления ВЛП.

С использованием мультиплексной мультилокусной ПЦР-РВ тест-системы было проведено семь циклов скрининга четырех исходных и шести экспериментальных линий мясного кросса кур бройлерного типа с начальной общей численностью 9029 цыплят. Если до начала программы эрадикации ВЛП подгрупп J и K число кур с неоплазиями составляло от 17 до 26 % в зависимости от линий (максимум наблюдали у линии с локусом *ev21*), то на 265-е сут после начала программы зафиксировали три

особи (0,10 %) с неоплазиями (при общей численности 2621 особь). Общая доля образцов с выявленной ДНК ВЛП подгрупп J и K в выборке из 2621 особи в возрасте 265 сут составила соответственно 0,67 и 0,04 %.

Таким образом, разработанные нами мультиплексные мультилокусные ПЦР-РВ тест-системы для одновременного выявления наиболее распространенных подгрупп вируса лейкоза птиц (А, В, J и К) и для одновременного выявления ВЛП подгрупп J и К показали свою высокую эффективность для обнаружения и эрадикации ВЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Payne L.N. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poultry Sci.*, 1998, 77(8): 1204-1212 (doi: 10.1093/ps/77.8.1204).
2. Payne L.N., Brown S.R., Bumstead N., Howes K., Frazier J.A., Thouless M.E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 801-807 (doi: 10.1099/0022-1317-72-4-801).
3. Li X., Lin W., Chang S., Zhao P., Zhang X., Liu Y., Chen W., Li B., Shu D., Zhang H., Chen F., Xie Q. Isolation, identification and evolution analysis of a novel subgroup of avian leukosis virus isolated from a local Chinese yellow broiler in South China. *Archives of Virology*, 2016, 161(10): 2717-2725 (doi: 10.1007/s00705-016-2965-x).
4. Gao L., Qin L.T., Pan W., Wang Y.Q., Lee Qi X., Gao H.L., Wang X.M. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, 16(10): 1637-1638 (doi: 10.3201/eid1610.100780).
5. 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: 36-42 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.36rus).
6. Peng H., Qin L., Bi Y., Wang P., Zou G., Li J., Yang Y., Zhong X., Wei P. Rapid detection of the common avian leukosis virus subgroups by real-time loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, 2015, 12: 195 (doi: 10.1186/s12985-015-0430-1).
7. Spencer J.L. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses -a review. *Avian Pathology*, 1984, 13(4): 599-619 (doi: 10.1080/03079458408418560).
8. Qin L., Gao Y., Ni W., Sun M., Wang Y., Yin C., Qi X., Gao H. Wang X. Development and application of real-time pcr for detection of subgroup J avian leukosis virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(1): 149-154 (doi: 10.1128/JCM.02030-12).
9. Kim Y., Gharaibeh S.M., Stedman N.L., Brown T.P. Comparison and verification of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) and real time RT-PCR for avian leucosis virus subgroup J. *Journal of Virological Methods*, 2002, 102(1-2): 1-8 (doi: 10.1016/S0166-0934(01)00372-X).
10. Smith L.M., Brown S.R., Howes K., McLeod S., Arshad S.S., Barron G.S., Venugopal K., McKay J.C., Payne L.N. Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Res.*, 1998, 54(1): 87-98 (doi: 10.1016/S0168-1702(98)00022-7).
11. Yang S., Lin S., Kelen G.D., Quinn T.C., Dick J.D., Gaydos C.A., Rothman R.E. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(9): 3449-3454 (doi: 10.1128/JCM.40.9.3449-3454.2002).
12. Lamien C.E., Lelenta M., Goger W., Silber R., Tuppurainen E., Matijevic M., Lucikins A.G., Diallo A. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1): 134-140 (doi: 10.1016/j.jviromet.2010.10.014).
13. Nakamura S., Ochiai K., Hatai H., Ochi A., Sunden U., Umemura T. Pathogenicity of avian leukosis viruses related to fowl glioma-inducing virus. *Avian Pathology*, 2011, 40(5): 499-505 (doi: 10.1080/03079457.2011.605783).
14. Cui N., Su S., Chen Z., Zhao X., Cui Z. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens. *J. Gen. Virol.*, 2014, 95(Pt 11): 2512-2522 (doi: 10.1099/vir.0.067264-0).
15. Shao H., Wang L., Sang J., Li T., Liu Y., Wan Z., Qian K., Qin A., Ye A. Novel avian leukosis viruses from domestic chicken breeds in mainland China. *Archives of Virology*, 2017, 162(7): 2073-2076 (doi: 10.1007/s00705-017-3344-y).
16. Chang S.W., Hsu M.F., Wang C.H. Gene detection, virus isolation, and sequence analysis of avian leukosis viruses in Taiwan country chickens. *Avian Diseases*, 2013, 57(2): 172-177 (doi: 10.1637/10387-092612-Reg.1).
17. Bacon L.D., Fulton J.E., Kulkarni G.B. Methods for evaluating and developing commercial chicken strains free of endogenous subgroup E avian leukosis virus. *Avian Pathology*, 2004,

- 33(2): 233-243 (doi: 10.1080/0307943042000195731).
18. Kansaku N., Guemene D., Nakamura A., Uchida M.. sequence characterization of *K*-gene linked region in various chicken breeds. *The Journal of Poultry Science*, 2011, 48(3): 181-186 (doi: 10.2141/jpsa.010072).
 19. Meng F., Li X., Fang J., Gao Y., Zhu L., Xing G., Tian F., Gao Y., Dong X., Chang S., Zhao P., Cui Z., Liu Z. Genomic diversity of the Avian leukosis virus subgroup J *gp85* gene in different organs of an infected chicken. *J. Vet. Sci.*, 2016, 17(4): 497-503 (doi: 10.4142/jvs.2016.17.4.497).
 20. Wang P., Lin L., Li H., Yang Y., Huang T., Wei P. Diversity and evolution analysis of glycoprotein GP85 from avian leukosis virus subgroup J isolates from chickens of different genetic backgrounds during 1989-2016: coexistence of five extremely different clusters. *Archives of Virology*, 2017, 163(2): 377-389 (doi: 10.1007/s00705-017-3601-0).
 21. Sung H.W., Reddy S.M., Fadly A.M. High virus titer in feather pulp of chickens infected with subgroup J avian leukosis virus. *Avian Diseases*, 2002, 46(2): 281-286 (doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0281:HVTIFP]2.0.CO;2).
 22. Zavala G., Jackwood M.W., Hilt D.A. Polymerase chain reaction for detection of avian leukosis virus subgroup J in feather pulp. *Avian Diseases*, 2002, 46(4): 971-978 (doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0971:PCRFD0]2.0.CO;2).
 23. Davidson I., Borenshtain R. The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leukosis virus, subgroup J. *Avian Pathology*, 2002, 31(3): 237-240 (doi: 10.1080/03079450220136549).
 24. Whitcomb J.M., Hughes S.H. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1992, 8: 275-306 (doi: 10.1146/annurev.cb.08.110192.001423).
 25. Bar-Magen T., Sloan R.D., Donahue D.A., Kuhl B.D., Zabeida A., Xu H., Oliveira M., Hazuda D.J., Wainberg M.A. Identification of novel mutations responsible for resistance to MK-2048, a second-generation HIV-1 integrase inhibitor. *Journal of Virological Methods*, 2010, 84(18): 9210-9216 (doi: 10.1128/JVI.01164-10).
 26. Pandiri A.R., Gimeno I.M., Mays J.K., Reed W.M., Fadly A.M. Reversion to subgroup J avian leukosis virus viremia in seroconverted adult meat-type chickens exposed to chronic stress by adrenocorticotrophin treatment. *Avian Diseases*, 2012, 56(3): 578-582 (doi: 10.1637/9949-092611-ResNote.1).

ИНП Институт медико-биологических исследований,
603000 Россия, г. Нижний Новгород, ул. Студеная, 10,
e-mail: Aborodinn@sinn.ru;

2ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН,
198095 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33,
e-mail: jalex@syntol.ru;

3ООО «Синтол»,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: jalex@syntol.ru ✉;

4Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства — филиал ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН,

198412 Россия, г. Санкт-Петербург—Ломоносов, ул. Черникова, 48,
e-mail: vnivip.lab@gmail.com;

5ФГБУ Селекционно-генетический центр «Смена»,
141327 Россия, Московская обл., пос. Березняки,
e-mail: Smena@tsinet.ru, dmi40172575@yandex.ru;

6ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН,
141315 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад,
ул. Птицградская, 10,
e-mail: olga@vnitip.ru, vnitip@vnitip.ru

Поступила в редакцию
2 февраля 2018 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 2, pp. 369-377

MULTIPLEX MULTILOCUS REAL TIME PCR FOR ANALYSIS AND CONTROL OF AVIAN LEUKOSIS VIRUS SUBGROUPS A, B, J AND K IN RUSSIA

A.M. Borodin^{1, 5}, *Ya.I. Alekseev*^{2, 3}, *N.V. Konovalova*³, *E.V. Terentyeva*³, *N.Yu. Serova*⁴,

¹Non-profit Partnership Institute of Medico-Biological Research, 10, ul. Studenaya, Nizhniy Novgorod, 603000 Russia, e-mail Aborodinn@sinn.ru;

²Institute for Analytical Instrumentation RAS, 31-33, ul. Ivana Chernykh, St. Petersburg, 198095 Russia, e-mail jallex@syntol.ru;

³LLC Syntol, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail jallex@syntol.ru (✉ corresponding author);

⁴All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science — Branch of Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, 48, ul. Chernikova, St. Peterburg—Lomonosov, 198412 Russia, e-mail vnivip.lab@gmail.com;

⁵Breeding and Genetic Center Smena, pos. Berezniki, Moscow Province, 141327 Russia, e-mail Smena@tsinet.ru, dmi40172575@yandex.ru;

⁶Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141315 Russia, e-mail olga@vnitip.ru, vnitip@vnitip.ru

ORCID:

Borodin A.M. orcid.org/0000-0002-1478-1261

Alekseev Ya.I. orcid.org/0000-0002-1696-7684

Konvalova N.V. orcid.org/0000-0003-4316-1077

Terentyeva E.V. orcid.org/0000-0003-2777-0948

Serova N.Yu. orcid.org/0000-0003-2121-2048

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was carried out according to the state task No. 007-01359-17-00 as part of the implementation of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Agriculture for 2017-2025, the subprogram “Creating domestic competitive meat crosses of broiler-type hens”.

Received February 2, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.369eng

Abstract

The avian leukosis virus (ALV) belongs to genus *Alpharetrovirus* of *Retroviridae* family and has a diploid genome consisting of a single-stranded RNA. ALV subgroups A, B, C, D, E, J and K are specific for chicken. The classification is based on differences in the viral coat protein structure. ALV, in particular ALV subgroup J, causes huge damage to industrial poultry. The gold standard for detecting ALV is virus isolation in CEFs or DF-1 cell cultures. This method has significant disadvantages, i.e. it takes 7-9 days, requires specialized facilities and equipment. Enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of the ALV p27 group-specific antigen is the most widely used, but it also has significant deficiencies, the main of which are false positive results due to the expression of p27 by endogenous viruses and lack of sensitivity. In this study, a test system has been developed to detect exogenous viruses of the most common ALV subgroups A, B, J, and K and to control the spread of ALV. To test the developed system, we use 1200 samples of broiler DNA from a poultry farm of the Moscow Province. Analysis of the samples detected ALV subgroup J in 51 % poultry flock and ALV subgroup K in 8 % poultry flock. No viruses of subgroups A and B were found. We also analyzed 97 DNA samples from chickens from the regions of Russia, i.e. Orenburg, Chelyabinsk, Kemerovo, Tyumen, Kaliningrad, Leningrad, Sverdlovsk, Novgorod regions and Krasnodar Territory. ALV subgroups K were found in samples from the Kaliningrad, Leningrad, Sverdlovsk, and Novgorod regions, ALV subgroups A in samples from the Leningrad region, and ALV subgroups J in the Sverdlovsk and Leningrad regions. ALV subgroup B has not been identified, that is, it may indicate that this subgroup of ALV is not common in Russia at the present time. At the next stage, measures were taken to eradicate the ALV of subgroups J and K found in the broiler-type meat cross lines in one of the farms of the Moscow Province. For this, a multiplex multilocus real-time PCR test system was developed and applied for the simultaneous detection of ALV subgroups J and K. Using the proposed test system, several screening cycles of four broiler-type chicken meat cross lines with an initial total of 9029 chickens were performed. Prior to the start of the program for control and eradication of ALV, the proportion of poultry with neoplasia ranged from 17 to 26 % depending on the line of chickens (the maximum was observed in the line with the *ev21* locus). On the 265th day after the start of the program for the control and eradication of ALV subgroups J and K, only three out of 2621 individuals (0.10 %) were diagnosed with a diagnosis of neoplasia, confirmed by positive results of real-time PCR as ALV subgroup J. Total percentage of individuals' samples containing ALV DNA of subgroups J and K in a sample of 2621 individuals at the age of 265 days were 0.67 % and 0.04 %, respectively.

Keywords: Avian leukosis virus, ALV subgroups A, B, J and K, real time PCR, ALV detection.

Научные собрания

MOSCOW CONFERENCE ON COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY (MCCMB)

(July 27-30, 2019, Moscow, Russia)

MCCMB is a biennial forum in up-to-date areas of computational biology. It takes place in Lomonosov Moscow State University with Russian and international scientists attended the conference.

Information: <http://vigg.ru/nauchnaja-deyatelnost/konferencii-i-shkoly/>