

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ГЕНО- ТА ПАТОТИПУВАННЯ ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ

Герілович А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Ньюкаслська хвороба – поширене в усьому світі вірусне захворювання численних видів свійської та дикої птиці, що зумовлює найбільший відсоток економічних збитків у наслідок вірусних хвороб у птахівництві. Робота присвячена порівнянню основних методів генотипування та патотипування вірусу ньюкаслської хвороби. Означені основні характеристики та показники інформативності рестрикційного картування, секвенування генів F та NP, порівняно класичну й альтернативну схему визначення генотипу і патотипу ВНХ. За допомогою вказаних методів досліджено 13 українських ізолятів вірусу НХ.

Ньюкаслська хвороба (псевдочума, парагрип птиці, НХ) – це надгостре, гостре, хронічне або безсимптомне (у залежності від вірулентності чинника) захворювання свійської та дикої птиці. Чинником НХ є РНК-вміщуючий параміксовірус роду *Avulavirus* – вірус ньюкаслської хвороби (ВНХ, Newcastle disease virus, NDV). За широтою спектру сприйнятливих видів НХ переважає будь-яку іншу хворобу птиці вірусної етіології. Характер перебігу, клінічних ознак та патологоанатомічних змін залежить від патотипової належності чинника [1, 2].

Своєчасна діагностика захворювання, моніторинг та прогнозування його поширення є важливими складовими систем контролю інфекції у світі. На сьогодні запропонована велика кількість методів з індикації та типування збудника. З метою виявлення вірусу застосовують методи ізоляції його в курячих ембріонах і клітинних культурах з наступною перевіркою гемаглютинуючих здібностей розплідки й ідентифікацією за реакцією затримки гемаглютинації [3, 4, 5].

Упродовж останнього часу все більшої популярності та значущості набувають молекулярно-генетичні методи виявлення чинника. До числа їх відносять як прості методи індикації, такі як ПЛР чи *in-situ* гібридизацію, так і методи складної диференціації на основі рестрикційного аналізу та філогенетичного аналізу секвенованих фрагментів геному збудника. Останні дозволяють встановити патотип вірусу та визначити його генотипову належність [1, 6, 7].

Метою нашої роботи було дослідження 13 українських ізолятів вірусу ньюкаслської хвороби, ідентифікованих у наших попередніх роботах методом ПЛР, за допомогою рестрикційного аналізу та секвенування.

Матеріали і методи. *Віруси.* У роботі були використані зразки РНК ізолятів вірусу ньюкаслської хвороби 1991–2008 років виділення та з ПЛР-позитивного патологічного матеріалу, які були люб'язно надані завідувачем лабораторії епізоотології вірусних хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ», кандидатом ветеринарних наук Музикою Д.В. (табл.).

Таблиця – Ізоляти вірусу НХ, застосовані для аналізу за методами рестрикційного аналізу та секвенування

№	Назва	Сайт розрізування	Патогенність	Генотип
1	2	3	4	5
1.	NDV/Ch/UA/01/03	RRQKRF	v	2
2.	NDV/Ch/UA/02/03	RRQKRF	v	5d
3.	NDV/Ch/UA/03/03	RRQKRF	v	5d
4.	NDV/Ch/UA/01-1/97	GRQRL	l	2
5.	NDV/Ch/UA/01/08	RRQKRF	v	5d
6.	NDV/Ch/UA/04/03	RRQKRF	v	4d
7.	NDV/Ch/UA/01/77	GKQRL	l	2

1	2	3	4	5
8.	NDV/Ch/UA/05/03	RRQKRF	v	5a
9.	NDV/Ch/UA/06/03	GRQGRL	l	2
10.	NDV/Ch/UA/07/03	GRQGRL	l	1
11.	NDV/Ch/UA/01/01	RSKKRF	m	2
12.	NDV/PI/UA/01/08	RRQKRF	v	5d
13.	NDV/PI/UA/02/08	RRQKRF	v	2

Напрацювання ампліконів генів NP та F0. На РНК-матрицях були отримані кДНК методом зворотної транскрипції, яку ампліфікували з використанням базових наборів Qiagen One-Step Ready Mix та систем праймерів NDV_n (на 580 п.н.-область гена NP) та AV1,2, NDV_fusionFF (на 325 та 345 п.н.-ділянки гена F0). Фрагменти ампліфікованої кДНК очищували в агарозному гелі, реекстрагували з нього та доочищували на колонках Qiagen DNA Extraction Kit.

Дослідження 580 п.н. фрагменту гена NP. Фрагмент гена NP обробляли 50Д ендонуклеази BstI0 за температури 37 °С упродовж 3 годин, після чого оцінювали характер профілів рестрикції. Також амплікон досліджували методом секвенування за АВІ модифікацією методу Сангера фрагменту довжиною 580 п.н., клонованого до вектору pBlunt (Invitrogen). Отриману хроматограму коригували в менеджері нуклеотидних послідовностей BioEdit та досліджували за допомогою алгоритму Neighbor Joining (MEGA 4.1).

Вивчення нуклеотидних послідовностей фрагментів гена F0 та генотипування вірусу НХ. Фрагменти гена F, отримані в ампліфікації з обома системами праймерів були секвеновані методом Сангера з застосуванням АВІ-технології. Послідовності з хроматограм секвенування були порівняні з кДНК-послідовностями різних генотипів, ідентифікованих Aldous E. При цьому досліджували гомологію топографії дендрограм з фрагментів франкованих праймерною парою AV1,2 та NDV_fusionFF.

Результати досліджень. На першому етапі проведених досліджень було встановлено належність усіх досліджуваних ізолятів до вірусу ньюкаслської хвороби, про що свідчила позитивність усіх досліджених зразків у реакції з праймерними парами всіх трьох різновидів.

Очищені зразки кДНК-ампліконів були застосовані для подальшого аналізу.

Після перетравлення 580 п.н.-фрагменту гена NP 50Д ендонуклеази BstI0 нами відмічено три варіанти патернів рестрикції, що відповідали належності вірусу до велогенного (у разі відсутності рестрикції), мезогенного штамів (неповне перетравлювання) або лентогенного (повна чи неповна рестрикція) патотипів. Ізолятам 1, 2, 3, 5, 8, 12 та 13 була властива відсутність рестрикції, внаслідок чого у гелі спостерігали лише одну фракцію продукту довжиною 580 п.н. (рис. 1).

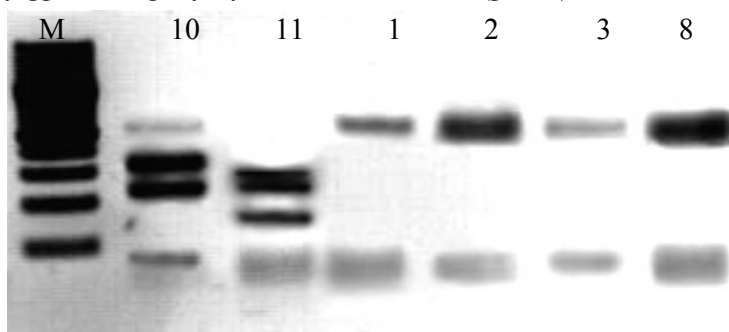


Рис. 1. Патерни рестрикції фрагменту гена NP вірусу НХ довжиною 580 п.н. після обробки ендонуклеазою BstI0 (М – маркер, номери зарзків відповідають номерам ізолятів)

Ізоляти 4, 7, 9, 10 демонстрували утворення фрагментів 300, 220 та 60 п.н., у той час, як віруси 6 та 11 демонстрували утворення фрагментів довжиною 240, 220 та 120 п.н. після збільшеного терміну інкубації з ендонуклеазою. У разі інкубації за стандартних умов перетравлення також не відбувалось.

Секвенування вказаних фрагментів гена NP кДНК збудника показало наявність характерних тандемних замінь у послідовностях аналізованих вірусів, що й виступило матеріальною основою розмаїття патернів рестрикції. Кладилично аналізовані ізоляти розподілились на дві основні групи, до першої з яких належать усі мезо- та лентогенні віруси, а до другої – велогенні варіанти. Дивергенція нуклеотидних послідовностей складала до 0,7 % для першої та до 1,2 % для другої групи вірусів.

До першої групи увійшли ізоляти 4, 7, 9, 10, 11, а до другої – решта (рис. 2).

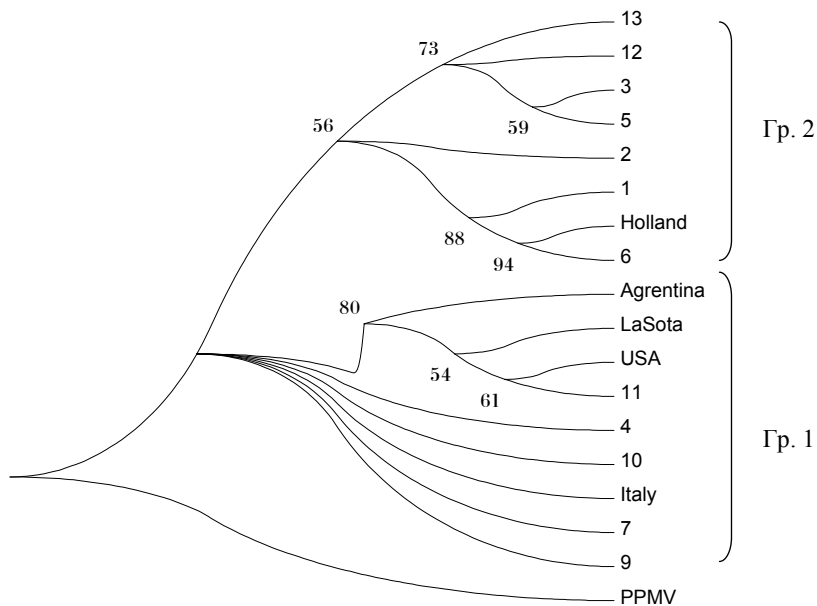


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків вірусів НХ за послідовністю гена NP ВНХ довжиною 580 п.н. (вкорінена, побудована за допомогою NJ-алгоритму)

Подальші дослідження були спрямовані на вивчення інформативності різних фрагментів гена F0 щодо встановлення генотипу вірусу. При цьому в порівняльному аспекті були оцінені послідовності ампліконів, отримуваних за методологією Aldous E. та праймерів NDV fusionFF (рис. 3–4).

Згідно з аналізом дендрограми, побудованої за алгоритмом NJ встановлено, що секвеновані послідовності гена F0 довжиною 325 п.н. 12 українських ізолятів відносяться до генотипів 1, 2, 4d, 5a та 5d. Структура сайту нарізання цих вірусів охоплювала всі три основні патотипи збудника. Всі ізоляти генотипів 4d (6), 5a (8) та 5d (2, 3, 5, 12) мали амінокислотну послідовність, типову для велогенних вірусів, у той час, як генотип 2 вмщував як ізоляти авірулентної (4, 9, 10), так і вірулентної природи (1, 11, 13), а генотип 1 – лише авірулентний штамп (7).

Дивергенція в групі штамів 2 генотипу досягала майже 20 % за секвенованим фрагментом. При цьому найбільшу гетерологічність послідовності демонстрував ізолят 13. Решта ізолятів різнилась від інших представників кладу на 4–12 %.

Представник генотипу 4d різнився від інших ізолятів на 5–12 %, при аналогічній дивергенції за групою в цілому. Вірус 1 генотипу мав до 10 % нуклеотидних відмінностей у своїй групі. ВНХ 5a генотипу різнився від представників своєї групи на 0–5 %.

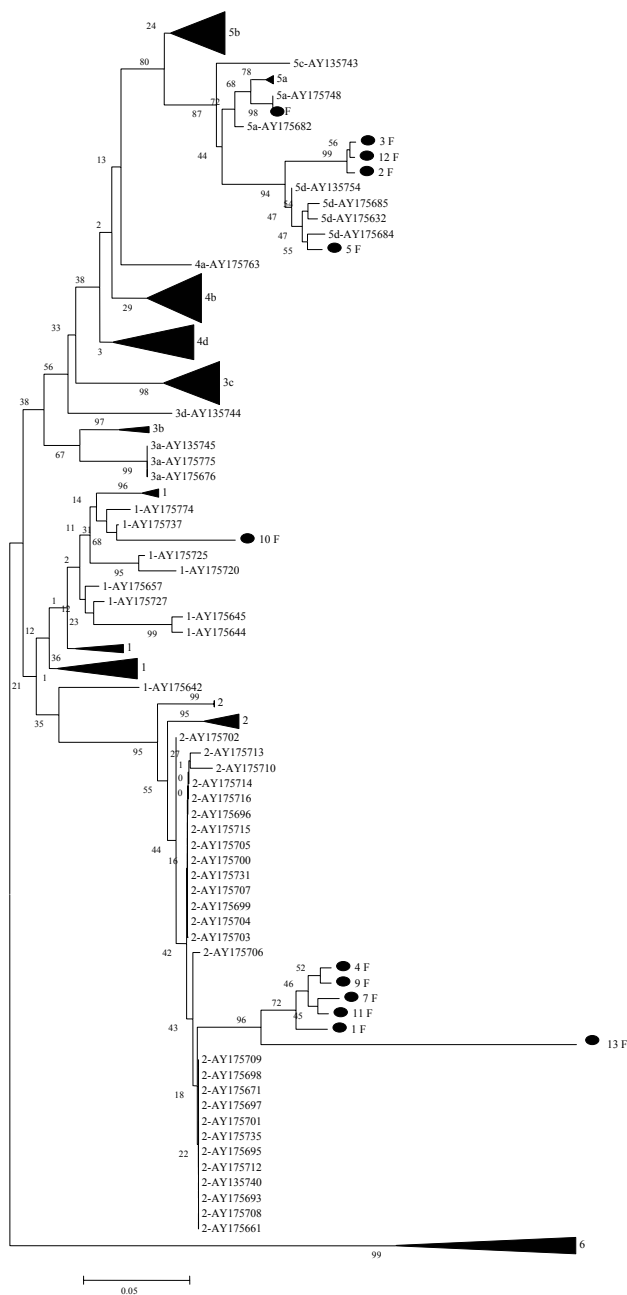


Рис. 3. Дендрограма генотипової належності українських ізолятів вірусу НХ (NJ, метод Aldous E., 2003)

Збудники генотипу 5d розподілились на два клади, перший з яких сформували лише українські ізоляти з дивергенцією в кладі до 2 %, у той час як вірус ізоляту 5 різнився від вірусу-прототипу на 5 %. Дивергенція за групою складала до 12 %.

Дослідження ампліконів гена F0 довжиною 345 п.н. цих же вірусів показало належність вірусів до аналогічних кладів за топографією, а саме до генотипу 1 віднесе-

но ізолят 7, до типу 2 – 1, 4, 9, 10, 11, 13, до 4d – 6, 5a – 8, 5d – 2, 3, 5, 12. Аналіз отриманої дендрограми та попарних відстаней аналізованих послідовностей показав, що рівень дивергенції при порівнянні двох методик секвенування лишився майже незмінним за генотип-репрезентуючими групами, а топографічні характеристики у межах кладів також залишилися стабільними. Структура амінокислотних послідовностей у ділянці сайту нарізання також виявилась ідентичною при аналізі даних секвенування обох фрагментів.

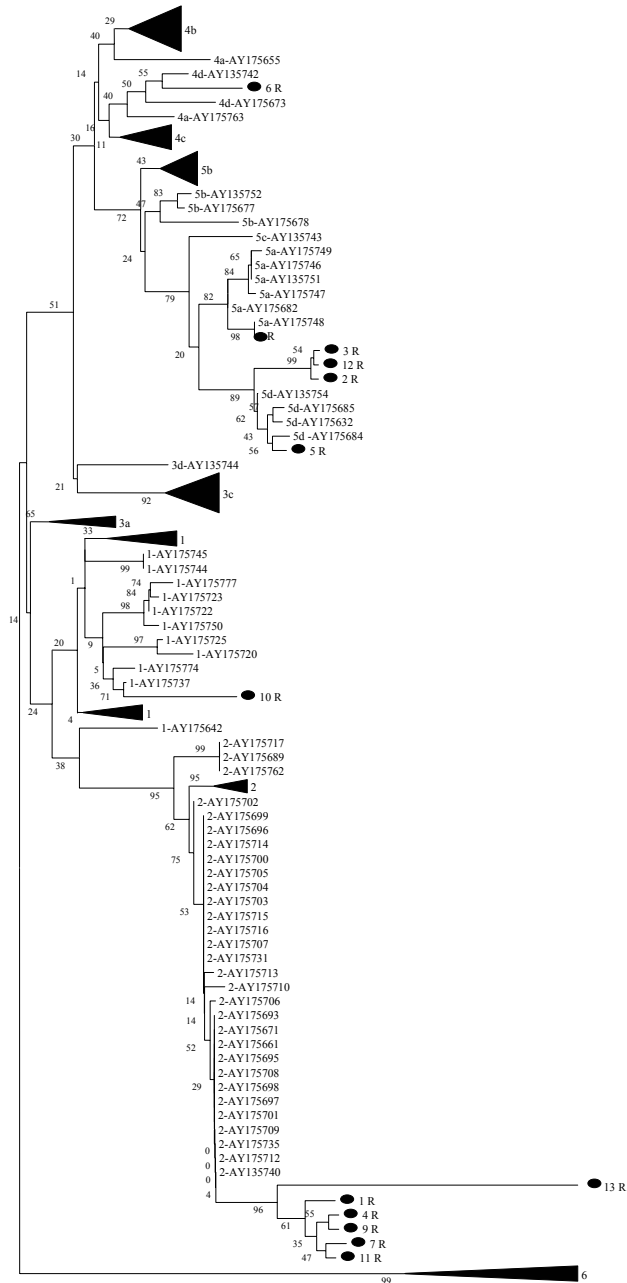


Рис. 4. Дендрограма генотипової належності українських ізолятів вірусу НХ (NJ, 345 п.н. ділянка гена F0)

Висновки. 1. Показано інформативність рестрикційного картування 580 п.н. ділянки гена NP вірусу ньюкаслської хвороби для патотипування збудника та відповідність його результатів даним секвенування цього фрагменту та фрагменту гена F0 у локусі сайту розрізання. **2.** Встановлено належність українських ізолятів вірусу НХ до генотипів 1, 2, 4d, 5a та 5d, а також доведено, що секвенування суміжних областей кладоспецифічної ділянки гена F0 репрезентує однакові результати при генотипуванні чинника.

Список літератури

1. Alexander, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections [Text] / Alexander D.J. // Diseases of Poultry / B.W. Calnek (Ed.). — 9th ed. — Iowa State Univ. Press, 1991. — P. 496–519.
2. Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland [Text] / Lindh E. [et al.] // J. Virol. — 2008. — Vol. 28. — P. 5–35.
3. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [Text] / O.I.E. — 6th ed. [text]. — Paris, 2008. — 1343 pp.
4. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis [Text] / Seal B.S. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — Vol. 33. — P. 2624–2630.
5. Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China [Text] / Tan L. T. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 2. — P. 750–753.
6. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene [Text] / Aldous E.W. [et al.] // Avian Pathol. — 2003. — Vol. 32, № 3. — P. 239–256.
7. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity [Text] / Collins M.S. [et al.] // Arch. Virol. — 1993. — Vol. 128. — P. 363–370.

MOLECULAR METHODS FOR NEWCASTLE DISEASE VIRUS GENOTYPING AND PATHOTYPING

Gerilovych A.P.

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

Newcastle disease is world-distributed viral disease of poultry and wild birds of big list of species. The work is devoted to comparison of main approaches for genotyping and pathotyping of NDVs on the base of molecular techniques. The main characteristics of restriction mapping, sequencing of NP and F genes were described. 13 field isolated were genotyped and pathotyped by these methods.

УДК 619:578.832.1: 636.5:616-07

РОЗРОБКА ПОЗИТИВНОГО КОНТРОЛЬНОГО ЗРАЗКА ГЕНА ГЕМАГЛЮТИНИНУ ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ СУБТИПУ Н7 ЄВРОПЕЙСЬКОГО ГЕНОТИПУ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Герілович А.П., Симоненко С.І., Болотін В.І., Солодянкін О.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

Робота присвячена створенню плазмідного вектору як позитивного контрольного зразка для діагностики грипу птиці (тип А, субтип Н7) з використанням методики виявлення РНК Європейського генотипу високопатогенного грипу птиці субтипу Н7 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, розробленої співробітниками Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». При створенні плазмідного контролю вибрані найбільш оптимальний тип вектора, підібрані й оптимізовані методи виділення й очистки плазмідної ДНК. Показана висока внутрішньовидова специфічність отриманого рекомбінантного контрольного зразка та його стабільність при зберіганні. Подальші дослідження будуть спрямовані на створення плазмідного контролю при діагностиці грипу птиці субтипу Н7 Американського генотипу.

Грип птиці — це захворювання, яке викликають будь-які віруси типу А, що належать до сімейства *Orthomyxoviridae*. Віруси типу А зустрічаються в людей, свиней, коней, інколи в інших ссавців, а також у багатьох видів птахів. Пташиний грип, як правило, не уражає диких птахів, однак, серед свійської птиці призводить до тяжкого захворювання та масової загибелі. Незважаючи на високу видоспецифічність