

and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus [Text] / S. Alexandersen [et al.] // J. Comp. Path. – 2003. – Vol. 129. – P. 268–282. 5. Annual OIE/FAO FMD Reference laboratory network, January-December 2009 [Electronic resource]. – Access mode : URL : http://www.foot-and-mouth.org. – Title from the screen. 6. OIE. World Animal Health in 2007 [Text]. – Paris, 2008. – 603 p. 7. Kitching, R.P. Identification of food-and-mouth disease virus carrier and cub clinically infected animals and different action from vaccinated animals [Text] / R.P. Kitching // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 531–538.

THE ADAPTATION OF THE FMD VIRUS TYPE O STRAIN NKR-2007 N 2041 TO CONTINUOUS CELL CULTURES

Sarkisyan Kh.V.

«Scientific Centre for Risk Assessment and Analysis in Food Safety Area», SNCO, Yerevan, Republic of Armenia

The possibility of adaptation of the FMD virus type O strain NKR-2007 N 2014 for transferring cell cultures BHK-21, ПСГК-30 have been studied. Signs for adaptation have been established for transferring cell cultures BHK-21 and ПСГК-30. This cell cultures can be interesting models for selection of the sensitive biological systems for cultivation of the above mentioned virus.

The adaptation of the virus O NKR-2007 N2041 at the investigated cell cultures have been done through intermittent passages. For this purpose after each passage the cells containing viruses have been removing from the glasses by using of the 0.25 % solution of trypsin and transferred to the monolayer primary trypsin cell culture of СП (cell culture from kidney of piglets). The condition of adaptive virus has been controlled through evaluation of the virus in the СП after passages. The replication and accumulation of the virus O NKR-2007 in the transferring cell culture have been evaluated by the method of titration in the primary cell culture СП.

УДК 636.09:615.371:636.2:636.4

ПАТО- ТА ГЕНОТИП ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ, ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В 1992-2011 рр.

Стегній Б.Т., Болотін В.І., Герілович А.П., Музика Д.В., Стегній А.Б., Рула О.М.

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

Афонсо К.

Південно-Східна дослідницька лабораторія з вивчення хвороб птиці, м. Атенс, США

Ньюкаслська хвороба (НХ) обумовлює значну ветеринарну проблему у присадибному та промисловому птахівництві. Це небезпечне вірусне захворювання завдає значних економічних збитків за рахунок знищення інфікованої птиці, згорання галузі, значного скорочення товарообміну птахівничою продукцією, витрат на карантинні, моніторингові, прогностичні, профілактичні та санітарно-оздоровчі заходи [1, 2].

На цей час досягнуті значні успіхи в питаннях ранньої діагностики та типування збудника НХ, що є запорукою ефективного контролю інфекції в промисловому птахівництві. Повноцінним компонентом систем діагностики, що раніше базувалась на низці серологічних і вірусологічних тестів, стали методи молекулярної діагностики та епізоотології [3].

У країнах-учасниках МЕБ упродовж останніх десяти років широко застосовується полімеразна ланцюгова реакція, тест з оцінки поліморфізму довжин фрагментів рестрикції та секвенування моніторингові роботи для встановлення особливостей молекулярної епізоотології таких економічно значущих та емергентних захворювань птиці, як НХ [4]. Одним з основних критеріїв оцінки вірулентності штамів ВНХ є первинна структура сайту розщеплення білку F0. Тому виникає необхідність проведення поглиблених досліджень нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу, виділених на території України, з метою створення вітчизняної системи пато- та генотипування.

Матеріали та методи. Досліджували 21 ізолят ВНХ, які зберігаються в колекції відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» (табл. 1).

Таблиця 1 –Перелік ізолятів, які були використані під час виконання роботи.

№ з/п	Назва ізоляту	Титр активності ГА	Від кого виділений
1.	PMV-1/Dunlin/SaltLake/Crime/2006	1:2048	Побережник
2.	PMV-1/Teal/Krasnooskilsky/5-11/2009	1:512	Чирянка велика
3.	NDV/Chicken/Kharkiv/66/2007	1:256	Курка
4.	NDV/Chicken/Ivano-Frankivsk/58/2007	1:256	Курка
5.	NDV/Chicken/Lyubotin/2003	1:128	Курка
6.	NDV/Chicken/LipovaDolina/2002	1:1024	Курка
7.	PMV-1/Duck/Taranivka/1992	1:2048	Качка
8.	PMV-1/Duck/Korobivka/1992	1:512	Качка
9.	PMV-1/Duck/Dokuchaevskiy/1992	1:512	Качка
10.	PMV-1/Pigeon/Donetsk/3/2007	1:512	Голуб
11.	Ukr/Dniprop/Pigeon-07/2007	1:128	Голуб
12.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/1/2007	1:256	Голуб
13.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/2/2007	1:2048	Голуб
14.	PMV-1/Rook/Izjum/8-15/2007	1:2048	Ворона
15.	Pigeon/Dnipropetrovsk/1-18-11	1:64	Голуб
16.	Pigeon/Simferopol/2-26-11	1:128	Голуб
17.	Pigeon/Ukromne/3-26-11	1:128	Голуб
18.	Mallard/Krasnoperekopsk/18-23-10/10	1:128	Крижень
19.	White-frontedGoose/ANI/48-15-02/11	1:128	Білолоба гуска
20.	RuddyShelduck/AN/37-15-02/11	1:256	Огар
21.	RuddyShelduck/AN/38-15-02/11	1:128	Огар

Екстракцію нуклеїнових кислот здійснювали за допомогою афінної сорбції з використанням суспендованих сорбентів «Рибо-сорб-50» (ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Росспоживнагляду», м. Москва, Російська Федерація). Отримані зразки РНК використовували для направлювання ДНК за допомогою комерційного набору для зворотної транскрипції РНК «Реверта-Л» (ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Росспоживнагляду», м. Москва, Російська Федерація) або «RT-Core» (ТОВ «Ізоген», м. Москва, Російська

Федерація). Отримані зразки ДНК зберігали за температури мінус 20 °С впродовж 1–4 тижнів та застосовували для постановки ПЛР у нативному або розведеному стані. Концентрацію кДНК визначали за допомогою спектрофотометру NanoDor за довжини хвилі 260 нм в об'ємі 1 мкл.

На наступному етапі досліджень проводили реакцію ампліфікації з використанням праймерів, які фланкують ділянку гена F довжиною 679 нуклеотидних залишків (н.з.) [5]. Термічні параметри реакції для виявлення вірусів склалися зі 45 хв зворотної транскрипції, 5 хв ініціальної денатурації та 40 циклів ампліфікації з 30 сек. денатурації за температури 94 °С, 30 сек. відпалу при 54 °С і 1 хв. елонгації за температури 72 °С, з наступною фінальною елонгацією при 72 °С впродовж 5 хв. У роботі використані базові реагенти з набору «PCR-Core, GenPack™» (ТОВ «Ізоген», м. Москва, Російська Федерація).

Дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції проведені з залученням спеціалізованого обладнання для класичної ПЛР фірм БіоКом, ДНК-Технологія (Російська Федерація) та BioMetra (Німеччина).

Проведення електрофоретичного аналізу здійснювали при використанні 1 та 1,5 % агарозного гелю. Електрофорез проводили при напруженості 7–20 В/см та силі струму 25–100 мА впродовж 20–120 хв в електрофоретичній камері фірми BioRad (США), а облік результатів електрофорезу проводили при дослідженні гелів на транслюмінаторі фірми БіоКом (Російська Федерація) з пронизуючим УФ-світлом.

Хімічний секвенс проводили з використанням комерційних наборів AbiPrism Terminator Kit (Applied Biosystems). Електрофоретичний аналіз продуктів реакції був здійснений на ДНК-аналізаторі ABI-3000 (AbiPrism) на базі Південно-Східної дослідної лабораторії з вивчення хвороб птиці (Атенс, США). Корегування секвенсу проводили за допомогою пакету програм DNASTar, LaserGene.

Побудову множинного вирівнювання з гомологічною ділянкою гену F, опублікованими у базах GenBank, здійснювали за допомогою on-line програми BLASTN 2.2.28 [6]. Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей було проведено за методом NeighborJoining [7] з використанням комп'ютерної програми Mega 4 [8].

Аналіз філогенетичного дерева здійснювали шляхом візуальної оцінки його топології та попарних відстаней між компонентами вибірки. При дослідженні філогенетичних зв'язків вірусів птиці до вибірок залучали послідовності ізолятів, виділених в інших країнах світу.

При вивченні варіабельності ВНХ застосовували три алгоритми порівняння: дослідження генотипспецифічних ділянок, патотипспецифічних ділянок та молекулярно-епізотологічне дослідження.

Результати досліджень. З метою встановлення пато- та генотипу з відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» до лабораторії надійшов 21 зразок екстраембріональної рідини курячих ембріонів, інфікованих різними ізолятами ВНХ, які були виділені від різних видів птахів в різних регіонах України протягом останніх 20 років (рис. 1).

На початку дослідження у всіх пробах розплодо ізолятів ВНХ, що аналізували, спостерігалось утворення ампліконів довжиною 679 н.з. Після вилучення з гелів та очищення концентрація ДНК у ампліконах становила 34–80 нг/мкл, що є достатньою для проведення секвенування.

Отримані нуклеотидні послідовності були проаналізовані з огляду на відповідну їм амінокислотну будову протеїну.

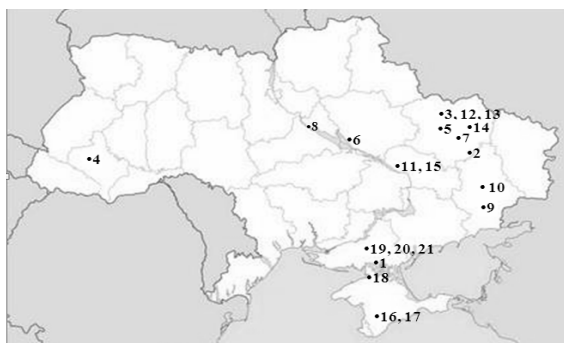


Рис. 1 Географія виділення ізолятів ВНХ (пронумеровано згідно табл. 1)

При встановленні патотипу ізолятів за амінокислотною послідовністю сайту розрізання фузійного протеїну чотирнадцять вірусів віднесено до лентогенних, а сім – до велогенних (табл. 2).

Таблиця 2 – Встановлення пато- та генотипу ізолятів ВНХ

№ з/п	Назва ізоляту	Клас, генотип	Сайт розрізання F0	Патотип
1.	PMV-1/Dunlin/SaltLake/Crime/2006	2, II	GKQGRL	лентоген.
2.	PMV-1/Teal/Krasnooskiysky/5-11/2009	2, Ib	GKQGRL	лентоген.
3.	NDV/Chicken/Kharkiv/66/2007	2, VII	RRQKRF	велоген.
4.	NDV/Chicken/Ivano-Frankivsk/58/2007	2, VII	RRQKRF	велоген.
5.	NDV/Chicken/Lyubotin/2003	2, VII	RRQKRF	велоген.
6.	NDV/Chicken/LipovaDolina/2002	2, VII	RRQKRF	велоген.
7.	PMV-1/Duck/Taranivka/1992	2, Ia	GRQGRL	лентоген.
8.	PMV-1/Duck/Korobivka/1992	2, Ia	GKQGRL	лентоген.
9.	PMV-1/Duck/Dokuchaevskiy/1992	2, Ia	GKQGRL	лентоген.
10.	PMV-1/Pigeon/Doneck/3/2007	2, II	GKQGRL	лентоген.
11.	Ukr/Dniprop/Pigeon-07/2007	2, II	GKQGRL	лентоген.
12.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/1/2007	2, II	GKQGRL	лентоген.
13.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/2/2007	2, II	GKQGRL	лентоген.
14.	PMV-1/Rook/Izjum/8-15/2007	2, II	GKQGRL	лентоген.
15.	Pigeon/Dnipropetrovsk/1-18-11	2, VI	KRQKRF	велоген.
16.	Pigeon/Simferopol/2-26-11	2, Ia	GKQGRL	лентоген.
17.	Pigeon/Ukromne/3-26-11	2, VI	KRQKRF	велоген.
18.	Mallard/Krasnoperekopsk/18-23-10/10	1,-	ERQERL	лентоген.
19.	White-frontedGoose/AN/48-15-02/11	2, XIV	RRQKRF	велоген.
20.	RuddyShelduck/AN/37-15-02/11	2, Ia	GKQGRL	лентоген.
21.	RuddyShelduck/AN/38-15-02/11	2, Ia	GKQGRL	лентоген.

За проведеними філогенетичними дослідженнями встановлено, що зразок Mallard/Krasnoperekopsk/18-23-10/10 належить до першого класу, а інші зразки – до другого. Дендрограму генотипової належності ізолятів подано на рисунку 2.

Визначення нуклеотидної послідовності ділянки гена F характеризує ізолят від білолобої гуски White-frontedGoose/AN/48-15-02/11 як представника генотипу XIV. Цей ізолят також має виражену спорідненість до штаму Chicken-2602-605-Niger-2008 (98 %), який у 2008 році спричинив ряд спалахів у країнах Західної та Центральної Африки [9].

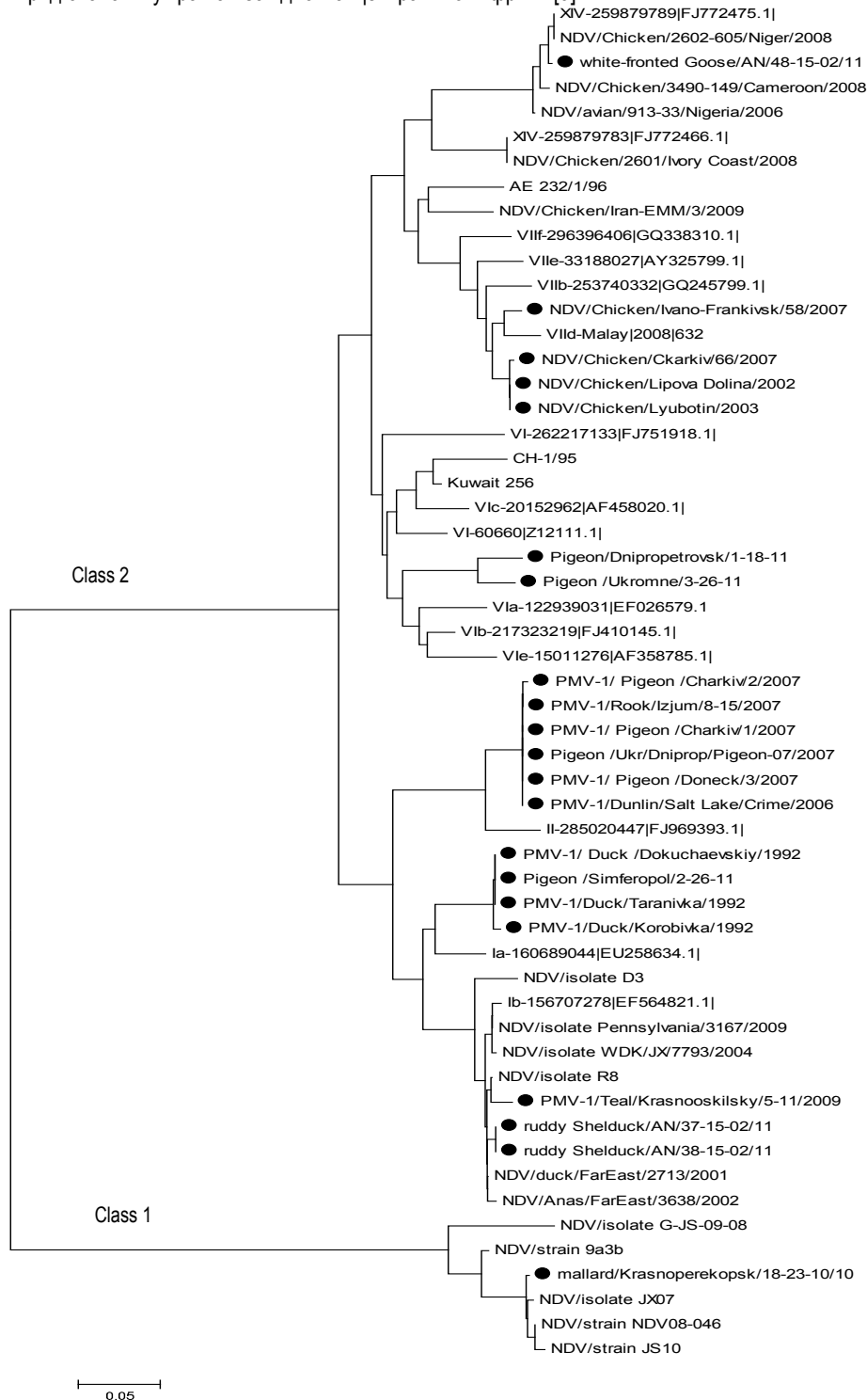


Рис. 2. Дендрограма, що вказує на генотипову належність українських ізолятів (позначено ●) ВНХ (NJ, Bootstrap 1000).

Ізоляти Pigeon/Dnipropetrovsk/1-18-11 та Pigeon/Ukromne/3-26-11 були виділені від голубів у Дніпропетровській області та АР Крим. Філогенетичний аналіз показав їх приналежність до VI генотипу, а також високий відсоток подібності до штамів Pi/Rus/Kostroma/0843/07 та Pi/Rus/Kemerovo/592-1/05, ізольованих від голубів на території РФ (рис. 3). До цього ж генотипу належать також ізоляти UA/Кур/ch/03, Україна/1травня/курка/111/2002, Україна/Київ/курка/284/2003 і Україна/Березанська/курка/187/2003, які були виділені від загинув курей у птахогосподарствах України впродовж 2002–2003 років [10].

Ізоляти, які формували другу геногрупу, були гомологічними за винятком PMV-1/ Pigeon /Charkiv/2/2007, при цьому дивергенція складала близько 1 %.

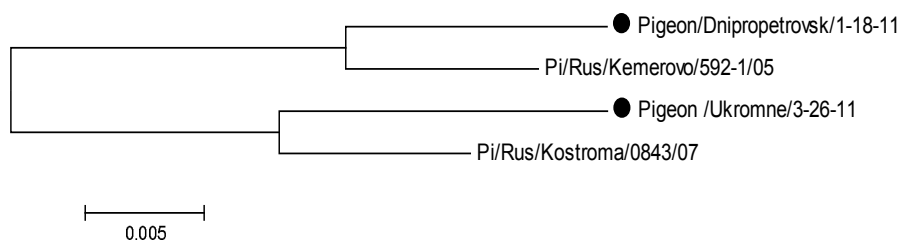


Рис. 3. Філогенетичні зв'язки двох ізолятів ВНХ VI генотипу зі штамми РФ (NJ, Bootstrap 1000). Ізоляти, виділені на території України (позначено ●)

Зразки від огарів RuddyShelduck/AN/37-15-02/11 та RuddyShelduck/AN/38-15-02/11 виявилися ідентичними та належать до першого генотипу. До цього ж генотипу також віднесені лентогенні віруси, які були ізольовані від диких птахів та голубів на території Харківської, Дніпропетровської та Херсонської областей. При цьому відзначали їх розподіл між субгенотипами та Ib.

Отже, згідно аналізу дендрограми, сконструйованої на основі послідовностей референтних штамів та аналізованих ізолятів, встановлено, що віруси українського походження належали до першого (n = 7), другого (n = 6), шостого (n = 2), сьомого (n = 4) та чотирнадцятого (n = 1) генотипів. Один ізолят мав послідовність, характерну для представників першого класу.

Аналіз даних щодо кількості замін у досліджуваній ділянці гена F дозволив встановити показники попарних відстаней між секвенкованими ділянками к ДНК українських та російських ізолятів з вакцинним штамом LaSota (табл. 3).

Так, попарні відстані всередині VI генотипу складали від 0,02 до 0,05, між LaSota, XIV та VI генотипами – від 0,21 до 0,27. Це вказує на те, що потенційно небезпечні епізоотичні ізоляти, циркулюючі серед диких птахів, суттєво відрізняються за нуклеотидним складом від вакцинного штаму, що зумовлює необхідність посилення засобів специфічної профілактики сприятливого поголів'я у птахогосподарствах за рахунок використання актуальних штамів ВНХ.

Таблиця 3 – Показники попарних відстаней між секвенкованими послідовностями ділянки гена F ВНХ

	1	2	3	4	5	6
1. La_Sota	—	—	—	—	—	—
2. Pigeon/Dnipropetrovsk/1-18-11	0,27	—	—	—	—	—
3. Pigeon_/Ukromne/3-26-11	0,25	0,05	—	—	—	—
4. Pi/Rus/Kemerovo/592-1/05	0,25	0,02	0,05	—	—	—
5. Pi/Rus/Kostroma/0843/07	0,25	0,04	0,02	0,04	—	—
6. White-frontedGoose/AN/48-15-02/11	0,25	0,21	0,23	0,21	0,22	—

Висновки. За результатами секвенування ділянки гена F 21-ого ізоляту ВНХ, виділених у різних регіонах України від дикої та свійської птиці в період з 1992 по 2011 рр., встановлено їх приналежність до п'яти генотипів, а саме: I, II, VI, VII і XIV.

За структурою сайтів розрізування білків F0 визначено, що 5 ізолятів є велогенними та мають високий ступінь подібності до ізолятів ВНХ, які тривалий час циркулювали на території Росії. Отримані результати дозволяють зробити припущення про їхнє загальне походження.

Ізоляти від голубів, а також від білолобої гуски визначені як велогенні та мають високий ступінь подібності до епізоотичних штамів, які спричинили спалахи у 2008 році в країнах Західної та Центральної Африки.

Список літератури

1. Avian Influenza and Newcastle Disease [Text] / D.E. Swayne [et al.] // Journal of the American Veterinary Association. – 2003. – Vol. 11. – P. 1534–1540.
2. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections [Text] / D.J. Alexander [et al.] // Diseases of Poultry / Y.M. Saif. – Iowa State Press, Ames, Iowa, 1993. – Vol. 11. – P. 63–80.
3. Genotyping of Newcastle disease virus strains, allocated in Ukraine in 1967–2007 (genotypes 1, 2 and 4) [Text] / A. Gerilovych [et al.] // Contemp. Agricult. – 2009. – Vol. 59, № 3–4. – P. 58–67.
4. Office internationale epizootical Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [Electronic resource] – Access mode: URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm. – Title from the screen.
5. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico [Text] / F. Perozo [et al.] // Avian Dis. – 2008. – Vol. 52. – P. 472–479.
6. A greedy algorithm for aligning DNA sequences [Text] / Z. Zhang [et al.] // J. Comp. Biol. – 2000. – Vol. 7. – P. 203–214.
7. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [Text] / N. Saitou, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 1987. – № 4. – P. 406–425.
8. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [Text] / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 2007. – № 24. – P. 1596–1599.
9. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa – implications for diagnosis and control [Text] / G. Cattoli [et al.] // Vet. Microbiol. – 2010. – Vol. 142. – P. 168–176.
10. Зандарян, С.Ю. Молекулярно-біологічні властивості штамів вірусу Ньюкаслської хвороби, виділених в Україні, та удосконалення діагностики [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / С.Ю. Зандарян ; ННЦ «ІЕКВМ». – Х., 2006. – 20 с.

DETERMINATION OF PATHO- AND GENOTYPE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUSES ISOLATED IN UKRAINE IN 1992-2011

Stegniy B.T., Bolotin V.I., Gerilovych A.P., Muzyka D.V., Stegnyy A.B., Rula O.M.

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Afonso K.

Southeast Research Laboratory for the Study of poultry diseases, of Athens, USA

The partial F gene sequencing of 21 Newcastle disease virus isolates obtained from wild and domestic birds in different regions of Ukraine in 1992-2011 was carried out. As the result of molecular-genetics investigations seven isolates of the virus were characterized as velogenic type due to the site structure of F0 protein. Phylogenetic analysis of obtained sequences provided determining the genotype of each isolate, as well the degree of similarity to other strains.