

УДК 619:636.5:619.578.832.1

СТВОРЕННЯ ЗАСОБІВ МОНІТОРИНГУ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ ТА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ НА ОСНОВІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Стегній Б.Т., Герілович А.П., Стегній А.Б.

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

Балим Ю.П.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Ничик С.А.

Головне управління ветеринарної медицини в Сумській області, м. Суми

Високопатогенний грип птиці та ньюкаслська хвороба є одними з найбільш контагіозних та вражаючих за обсягами економічних збитків вірусних захворювань численних видів свійської та дикої птиці всіх вікових груп.

Упродовж останніх трьох років панзоотія грипу птиці охопила майже весь Євразійський континент. Епізоотична небезпека, що склалася, зумовлена циркуляцією високопатогенних варіантів вірусу грипу птиці субтипу H5N1. Зважаючи на високу нестабільність генетичної організації вірусу, чий геном представлений у вигляді 8 фрагментів РНК, існує потенційний ризик швидкоплинної мінливості та рекомбінації збудника, що призводить до змін в його антигенній структурі та знижує ефективність застосування вакцинних препаратів зі штамів, які були ізолювані у попередні роки.

Вченими різних країн було відмічено наявність кількох груп ізолятів, які відрізнялися за нуклеотидним складом генів гемаглютиніну, нейрамінідази та головного вірусного тегументу [1, 2]. Розподілення ізолятів на відповідні субтаксони за якісним складом їх генетичного матеріалу надає можливість, по-перше, скласти уяву про екологічні взаємовідносини в системі вірус-хазяїн для вивчення шляхів міграції переносників вірусу та прогнозування епізоотичної ситуації, по-друге, ефективно конструювати молекулярно-генетичні тест-системи для індикації та ідентифікації РНК збудника, по –третє, побудувати стратегію заходів боротьби з захворюванням і ліквідації епізоотичних осередків.

У епізоотичному відношенні високопатогенний грип та ньюкаслська хвороба часто взаємопов'язані: сучасне загострення ситуації нерідко зумовлюється асоційованим перебігом, випадки якого описані серед дикої птиці. З огляду на це МЕБ рекомендує проводити паралельні дослідження з метою виявлення таких змішаних інфекцій [3].

У ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини» моніторингові дослідження щодо грипу та ньюкаслської хвороби серед дикої птиці проводяться впродовж майже 10 років. Було виділено ряд епізоотичних ізолятів збудників пташиного грипу під час спалахів цього захворювання в АР Крим. Їх було ідентифіковано, як представників високопатогенного субтипу H5N1, а також вірусу ньюкаслської хвороби.

Як показали наші дослідження, використання традиційних вірусологічних та серологічних тестів не завжди є достатньо ефективними.

Мета роботи. Створення системи методик з виявлення РНК вірусів грипу та ньюкаслської хвороби на основі ПЛР-аналізу.

Матеріали і методи. Для проведення досліджень було використано інактивовані формаліном та β -пропіолактоном зразки ембріонального розплідки штамів Influenza A virus/курка/Сиваш/02/2005/H5N1 та Influenza A virus /курка/Приморський/01/2006/H5N1 високопатогенного вірусу грипу птиці (ВВПГ), ізолюваних під час спалаху хвороби серед курей в АР Крим, а також зразки ембріон-адаптованого вірусу – антиген вакцини «АвіФлуВак-ІЕКВМ» з титром не нижче $9 \log_2$ в реакції гемаглютинації, віруси ньюкаслської хвороби штамів LaSota (жива вірус-вакцина, Lohmann AN GmbH) та ЛГ-85. Для перевірки специфічності методики були застосовані зразки кДНК референтних штамів вірусів грипу А (H1, H2, H4, H5 (N1 і N3), H7, H10) та В, а також хвороби Гамборо з колекції відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ».

Для створення баз даних секвенованих послідовностей основних генів та повністю секвенованих послідовностей сегментів РНК вірусів грипу та геномної РНК вірусу ньюкаслської хвороби (ВНХ), наведених у міжнародних базах даних EMBL, DDBJ та GenBank, у режимі on-line з мережі Internet були отримані послідовності ізолятів вірусу грипу А та ньюкаслської хвороби, які розподіляли на підбази. Кожна з них містила тільки інформацію про нуклеотидний склад генів ГА, НА та М вірусу грипу, а також гена F вірусу ньюкаслської хвороби.

Множинне вирівнювання послідовностей, показники ентропії ділянок, характер замінів та пошук консервативних регіонів здійснений за допомогою програми BioEdit v.5.2.9. та її модулів - ClustalW та Neighbor.

Консервативні ділянки, виявлені при аналізі структури генів М, гемаглютиніну, нейрамінідази вірусу грипу А та гену F вірусу ньюкаслської хвороби, аналізували щодо наявності ймовірних праймерних пар за допомогою програми AmplyX v.1.1.2 для Win98. Параметри якості послідовностей та оптимізацію ампліфікаційних термоциклів проаналізовані в програмах пакету OLYGOSoft.

Ізоляцію вірусної РНК проводили за допомогою комерційного набору «РИБО-сорб-50» виробництва «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Росія). Виділені зразки РНК було використано як матрицю для напрацювання кДНК. Реакцію зворотної транскрипції (РЗТ) проводили за допомогою ревертази виробництва фірми Fermentas (Латвія) та набору «Реверта-Л» виробництва «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Росія).

Параметри ампліфікації генів гемаглютиніну та нейрамінідази відпрацьовували та удосконалювали за допомогою базових наборів «АмпліСенс К-200» «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Росія) та Мастер-Міксу виробництва фірми Fermentas (Латвія). При цьому емпірично підібрано пропорцію внесення проби кДНК, концентрацію іонів магнію, полімерази, дНТФ, загальний об'єм суміші, температуру віджигу і кількість ампліфікаційних циклів.

Випробування чутливості та специфічності методик було проведено з використанням гетерологічних за гемаглютиніном та нейрамінідазою штамів вірусу грипу А, а також зразків біомаси РНК-вміщуючих вірусів птиці.

Результати досліджень. За допомогою програми Bioedit було вивчено ступені спорідненості та варіабельності послідовностей гена ГА 98 ізолятів та гена НА 87 ізолятів вірусу грипу птиці, виділених під час основних епізоотій 1967-2005 рр., які були зареєстровані на Євразійському континенті.

Консервативні ділянки генів ГА та НА було проаналізовано щодо наявності праймерних пар. За допомогою програми для дизайну праймерів AmplyX v.1.1.2 підібрано 18 та 12 можливих праймерних пар, відповідно. На наступному етапі аналізу було обрано по 4 пари праймерів, які мали ПЛР-quality 80-100 % (не утворюють димерів, шпильок, мають GC - співвідношення на рівні 50 %).

При аналізі їх щодо специфічності було проведено віртуальну ампліфікацію всіх цих пар з ГА- та НА-генами 55 штамів H5N1-субтипу. Встановлено, що лише три пари (AivH5 (1 та 2) та AivN1) здатні до ампліфікації з усіма послідовностями, фланкують 487 п.н. та 425 п.н. ділянки генів ГА та НА, відповідно.

Дослідження специфічності системи розроблених праймерів AivH5 показали, що проби сумарної кДНК гетерогенних контролів (сумарна кДНК від курячих ембріонів, інфікованих штамом LaSota вірусу ньюкаслської хвороби, УМ-93 вірусу хвороби Гамборо та вірусами грипу інших субтипів, що входять до складу «Грипозної вакцини») не утворювали смуг після реакції.

Після лабораторного випробування методики на її основі створено «Тест-систему для виявлення РНК високопатогенного вірусу грипу птиці» (ТУ У 24.4-00497087-060:2007). Для комісійного випробування тест-системи на специфічність, чутливість та відсутність перехресних реакцій при дослідженні матеріалу, інфікованого сторонніми вірусами, було використано наступні зразки:

- екстраембріональна рідина (ЕЕР) інтактних курячих ембріонів;
- ЕЕР курячих ембріонів, інфікованих штамом вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/06/Н5Н1 з титром у РГА 1:16, 1:256 та 1:512;
- ЕЕР курячих ембріонів, інфікованих гетерологічним за нейрамінідазою штамом вірусу грипу А А/крачка/Південна Африка/61/Н5Н3,
- ЕЕР курячих ембріонів, інфікованих гетерологічними за гемаглютиніном та нейрамінідазою штамми вірусу грипу А: А/качка/Альберта/60/70/Н12Н5,
 - А/курка/Росія/5/87/Н7Н1,
 - А/курка/Німеччина/Н/49/Н10Н7,
 - А/качка/Чехія/56/Н4Н6,
 - А/свиня/Айова/Н1Н1;
 - гетерологічні збудники:
- вірус ньюкаслської хвороби, вірус хвороби Гамборо, зразки яких підтримуються у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ».

Специфічність визначено за кількістю встановлених негативних проб, а чутливість – за кількістю правильно визначених позитивних проб. Показником відтворюваності реакції слугувало дворазове повторення одержаних результатів із співпаданнями в усіх пробах.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг у 3 пробах екстраембріональної рідини від інфікованих вірусом грипу субтипу Н5Н1 курячих зародків та в треку позитивного контрольного зразка (сумарні РНК з інактивованої екстраембріональної рідини). Проби РНК з матеріалу від інтактних ембріонів після ампліфікації не утворювали смуг амплікону.

Проби сумарної РНК гетерогенних контролів не утворювали специфічних смуг після ампліфікації.

Після ампліфікації 425 п.н. ділянки НА-гена з системою праймерів AivN1 з позитивними та інтактними зразками встановлено наявність специфічних смуг у 5 досліджених пробах екстраембріональної рідини інфікованих ВВГП зародків, а також в треку позитивного контрольного зразку кДНК вірусу ВВГП (живого вірусу штаму Influenza virus A/chicken/Sivash/02/06/Н5Н1, оскільки ген нейрамінідази інактивованого формаліном вірусу не ампліфікується на відміну від гену гемаглютиніну). Проби кДНК з клінічного матеріалу від інтактних ембріонів після ампліфікації смуг ампліконів не утворювали.

Дослідження специфічності системи розроблених праймерів показали, що проби сумарної кДНК гетерогенних контролів (сумарна кДНК від курячих ембріонів, інфікованих штамом LaSota вірусу ньюкаслської хвороби, УМ-93 вірусу хвороби Гамборо та вірусами грипу інших субтипів, що входять до складу «Грипозної вакцини») також не утворювали смуг після реакції (рис. 1).

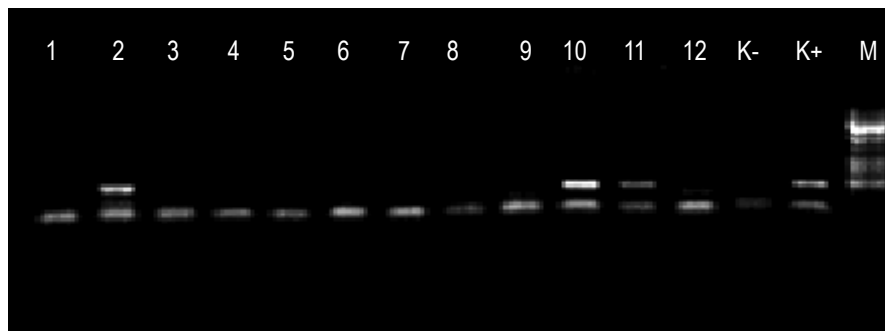


Рис. 1 Електрофореграма з результатів ПЛР: 1 – ЕЕР інтактних курячих ембріонів; 2 – розплідка штаму А/курка/Сиваш/02/06/Н5Н1 у розведеннях 1:16, 10 – 1:256 та 11 – 1:512; 3-8 – гетерологічний за нейрамінідазою штам вірусу грипу А А/крачка/Південна Африка/61/Н5Н3, гетерологічні за гемаглютиніном та нейрамінідазою штамми вірусу грипу А (зразки екстраембріональної рідини від інфікованих курячих ембріонів): А/качка/Альберта/60/70/Н12Н5, А/курка/Росія/5/87/Н7Н1, А/свиня/Айова/Н1Н1, А/курка/Німеччина/Н/49/ Н10Н7, А/качка/Чехія/56/Н4Н6; 7 – вірус ньюкаслської хвороби; 12 – вірус хвороби Гамборо.

З метою розроблення дизайну специфічних праймерів для індикації вірусу грипу А були проаналізовані 28 послідовностей гена М, що був таргетним при розробці методики. Отримані праймери були названі IV_A_M_f та г. Встановлено, що вони є специфічними по відношенню до кДНК вірусу грипу А 7 субтипів (Н1, Н2, Н4, Н5(Н1 та Н3), Н7, Н10), фланкуючи ділянку довжиною 560 п.н. Специфічність праймерної системи та розробленої на її основі методики доведена виявленням ділянки кДНК розрахункової довжини в зразках 7 підтипів вірусу грипу А, і його відсутністю в зразках генетичного матеріалу вірусів грипу В, ньюкаслської хвороби та інфекційної бурсальної хвороби.

Заключним етапом наших досліджень було визначення перспективних послідовностей та розробка ПЛР-методики для виявлення РНК вірусу ньюкаслської хвороби. Аналіз усіх досліджених послідовностей після вирівнювання показав наявність численних малих (3-15 п.н.) та п'яти великих (понад 15 п.н.) консервативних ділянок в структурі F-гену вірусу ньюкаслської хвороби. Середня ентропічність досліджених ділянок коливалась від 0,024 до 0,058.

Проведений аналіз цих консервативних ділянок показав, що з числа віднайдених дві мають довжину, яка є мінімальною для праймерного дизайну. Результати скринінгу ділянки дозволили виявити високий ступінь паліндромності деяких консерватив-

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

них ділянок нуклеотидної послідовності гену F, що є причиною ймовірного виникнення вторинних неканонічних структур (у т.ч. два варіанти шпилькоутворення з великою петлею 7-8 п.н.).

Зважаючи на наявність лише однієї перспективної ділянки для пошуку праймерів, в якій теоретично вторинні структури були представлені незначним чином, вирішено провести дизайн лише на повних послідовностях гену F із залученням вироджених зон. Аналіз консервативних ділянок гену дозволив виявити 8 праймерних пар, з числа яких була обрана одна найбільш перспективна, котра фланкує 345 п.н. ділянку гена F ВНХ. Ця пара (NDV fusion FF/RR) мала високі параметри ПЛР-якості у відношенні димерізації та самогібридизації, не утворювала вторинних неканонічних структур, мала високе GC-співвідношення та температуру плавлення 64 °С.

Після емпіричного підбору параметрів визначено, що максимальну чутливість і специфічність методика зберігає при температурі відпалу 62 °С, концентрації іонів магнію в реакційній суміші на рівні 2,5-3,0 мМ/мл.

Аналіз специфічності методики показав здатність до ампліфікації лише кДНК вірусу НХ та її неспроможність реагувати з кДНК вірусів грипу А і В, а також кДНК вірусу хвороби Гамборо (рис. 2).

Розроблені методики було апробовано на майже 500 зразках від дикої та домашньої птиці, у результаті чого виявлено 32 позитивних щодо вірусу грипу А зразків, 12 з них – щодо субтипу Н5Н1 та ідентифіковано 6 ізолятів ВНХ. Проведено генотипування вказаних вірусів за напрацьованими ампліконами, яке показало належність вірусів грипу до європейської та азійської генетичних ліній, а вірусу ньюкаслської хвороби – до генотипів 2, 4 та 5.

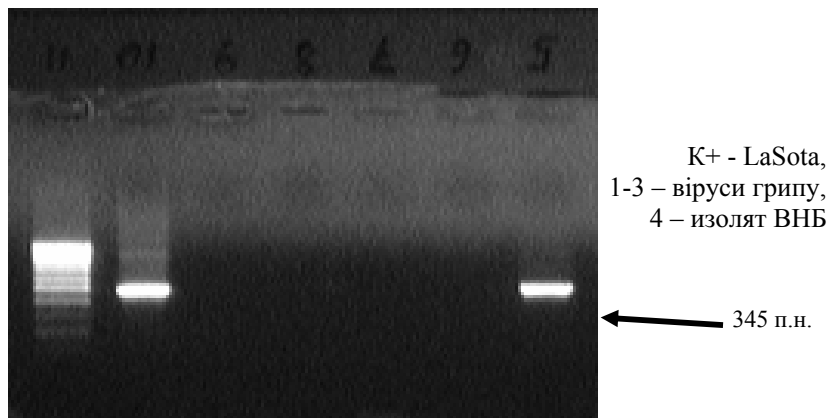


Рис. 2 Результати перевірки специфічності праймерів до гена F вірусу ньюкаслської хвороби

Висновки.

1. Розраховані праймери AivH5, AivN1, IV-A-M, які характеризуються високими показниками ПЛР-quality та фланкують високоріабельні ділянки генів GA, HA та M вірусу грипу довжиною 487, 425 та 560 п.н., відповідно, які запропоновано використовувати для діагностики грипу та ідентифікації ізолятів N1- та H5-субтипу.

2. Запропоновано праймери для виявлення РНК вірусу ньюкаслської хвороби за геном F (345 п.н. ділянка).

3. Апробація методик на зразках генетичного матеріалу гомологічних та гетерологічних вірусів птиці показала високу специфічність запропонованих методик. При дослідженні 200 зразків клінічного матеріалу від дикої та домашньої птиці було ідентифіковано РНК вірусу грипу А - в 12 зразках, в т.ч. субтипу Н5 – в 7, а також РНК ВНХ – в 6 пробах.

Перспективи подальших досліджень. Планується застосувати розроблені тести для широких моніторингових досліджень та поглибити їх молекулярно-епізоотологічну цінність за рахунок відпрацювання методів секвенс-аналізу на їх основі (дослідження поліморфізму сайту нарізання GA-гену вірусу високопатогенного грипу та гіперваріабельної ділянки гену F вірусу ньюкаслської хвороби).

Список літератури

1. Lee, C.W., Suarez, D.L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination // *Anim Health Res Rev.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1-15.
2. Kida, H., Ito T., Yasuda J. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs // *J Gen Virol.* – 1994. – Vol. 75. – P. 2183-2188.
3. Highly pathogenic avian influenza // *O.I.E. Manual standards for diagnostics tests and vaccines*, adopted 05.2005.

DEVELOPMENT OF SYSTEM FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE BASED ON PCR-MONITORING

Stegniy B.T., Gerilovych A.P., Stegnyy A.B.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

Balym Yu.P.

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov

Nychyk S.A.

Main Department of Veterinary Medicine in Sumy Region

Highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease represent significant danger to the countries with advanced poultry breeding, is especial in conditions modern difficult situation concerning these diseases all over the world.

On the basis of the carried out analysis specific primers were offered and the techniques of RNA revealing of influenza virus and Newcastle disease virus. The developed techniques have appeared effective as at laboratorial and field samples.

It is long term plane to apply the developed tests for wide monitoring researches.