

УДК 616.98:578.824.11:616-036.22

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВУЛИЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ СКАЗУ ВИДІЛЕНИХ ВІД ДОМАШНІХ І ДИКИХ М'ЯСОЇДНИХ ТВАРИН З ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Мазур М. В.*, Полупан І. М.

Інститут ветеринарної медицини НААН, Київ, Україна, e-mail: mazur_mykola1991@ukr.net

У статті наведенні результати молекулярно-генетичних досліджень ізолятів вірусу сказу виділених від домашніх (коти та собаки) і диких м'ясоїдних тварин (лисиць) з території України за 2009–2012 рік.

Встановлено, що вуличні ізоляти належать до першого генотипу, першої філогрупи ліссавірусів тварин, генетична однорідність яких становить 99,8 % за амінокислотним складом. Однак, встановлено їхній розподіл на 4 кластери за географічним розташуванням.

Ключові слова: сказ, вуличні ізоляти, філогенетичний аналіз

Сказ (гідрофобія, рабічна інфекція) – зооноз, для якого характерним є ураженням центральної нервової системи (ознаками поліенцефаломієліту) та абсолютна летальність [1, 2]. Захворювання є надзвичайно складною проблемою для багатьох країн світу, у тому числі України, яка є однією із найбільш неблагополучних щодо сказу країн Європи.

Значна кількість випадків захворюваності на сказ пов'язана із збільшенням частоти контактів домашніх тварин з безпритульними і дикими, що обумовлено спільною кормовою базою, розширенням території міст за рахунок зон степу і лісостепу, які раніше були зонами природного проживання диких тварин, недостатнім рівнем специфічної імунопрофілактики, ослабленням контролю за виконанням правил утримання собак і котів, зростанням популяції бродячих собак і котів, відсутністю контролю за популяцією лисиць тощо [3].

У той же час потрібно враховувати природу вірусу сказу (ряд *Mononegavirales*, родина *Rhabdoviridae*, рід *Lyssavirus*) та циркуляцію різних генотипів у різних географічних зонах [4]. Тому, проведення молекулярно-генетичних досліджень повинно бути невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики сказу з обов'язковим виділення рибонуклеїнової кислоти (РНК) вірусу та подальшого філогенетичного аналізу.

Мета роботи провести філогенетичний аналіз ізолятів вірусу сказу з території України за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Матеріали та методи. У роботі використано 47 патологічних матеріалів, які були отримані від 3 видів тварин: котів – 18 зразків, собак – 15 зразків і лисиць – 14 зразків з 14 областей України в період 2009–2012 рр. Зразки були визнані позитивними на сказ в регіональних державних лабораторіях ветеринарної медицини за допомогою методу флуоресціюючих антитіл (МФА) в реакції прямої імунофлуоресценції та біопробою.

Біологічна проба. Виділення вірусу (біопроба) проводили на білих мишах масою 6–8 г за методом Корговски Н. (1996 р.) [5]. Специфічність біопроби підтверджували реакцією прямої імунофлуоресценції (РПІФ).

Зворотньо-транскриптазна полімеразно-ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР). Для постановки ЗТ-ПЛР використано олігонуклеотидні праймери, які комплементарні до N-гену вірусу сказу JW6DPL (CAATTCGCACATTTTGTG) – позиція 660-641 та JW12 (ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG) – позиція 55-73.

Екстракцію РНК проводили тест-системою QIAampViral RNA MiniKit згідно настанови виробника. Для постановки ЗТ-ПЛР використовували попередньо підготовлені зразки, з додаванням реакційної суміші, ензимів MixSuperscript III/PlatinumTaq, 2-ох олігонуклеотидних праймерів JW6DPL і JW12, води для ПЦР. Реакція складалася з 35 циклів. Ампліфікація дослідних зразків виконувалася в ампліфікаторі PCR SystemProFlex згідно інструкції.

Продукти ампліфікації очищали з використанням комерційного набору (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN).

Очищені амплікони секвенували в обох напрямках з використанням пари праймерів, яку використовували в ЗТ-ПЛР, автоматизованого секвенатора HELICON «Applied Biosystems ABIPRISM» та набору BigDye Sequencing Kit (Applied Biosystems) з GeneScan програмним забезпеченням для аналізу.

Філогенетичний аналіз. Нуклеотидні послідовності були вирівняні з використанням Clustal W множинного вирівнювання і візуалізовані з використанням програмного забезпечення BioEdit v.7.0.5.3.

З метою визначення філогенетичної спорідненості, дослідні зразки були порівняні із обраними з GenBank еталонними генетичними послідовностями вакцинних штамів вірусу сказу (JX276550, EF206709, EF206708), які використовуються при виробництві антирабічних вакцин.

Аналіз результатів секвенування проводили з використанням пакету електронних програм MEGA 6.06.

Результати досліджень. Після підтвердження діагнозу рутинними методами, 47 патологічних матеріалів, були досліджені в ЗТ-ПЛР з використанням пари праймерів JW6DPL та JW12, які використовуються для виділення всіх відомих генотипів ліссавірусів.

Постановкою ЗТ-ПЛР також підтверджено наявність генетичного матеріалу вірусу сказу в усіх пробах патологічного матеріалу. У подальшому було проведено секвенування РНК виділених зразків вірусу сказу.

* Аспірант, науковий керівник – кандидат ветеринарних наук, с.н.с. Полупан І.М.

Наступним етапом роботи було проведення аналізу результатів секвенування: порівняння зразків між собою та вакцинними штамми, які є типовими представниками I-ої філогрупи 1-го генотипу ліссавірусів тварин, послідовності яких внесені до GenBank. Для філогенетичного аналізу дослідних зразків були побудовані дендрограми за допомогою програми MEGA 6.06. (Рис. 1).

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції досліджуваних зразків між собою та вакцинними штамми, було встановлено, що польові ізоляти за своїми генетичними характеристиками однорідні, належать до I-ої філогрупи 1-го генотипу ліссавірусів тварин.

Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8 % за амінокислотним складом, що є типовим для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території країн північно-східної Європи.

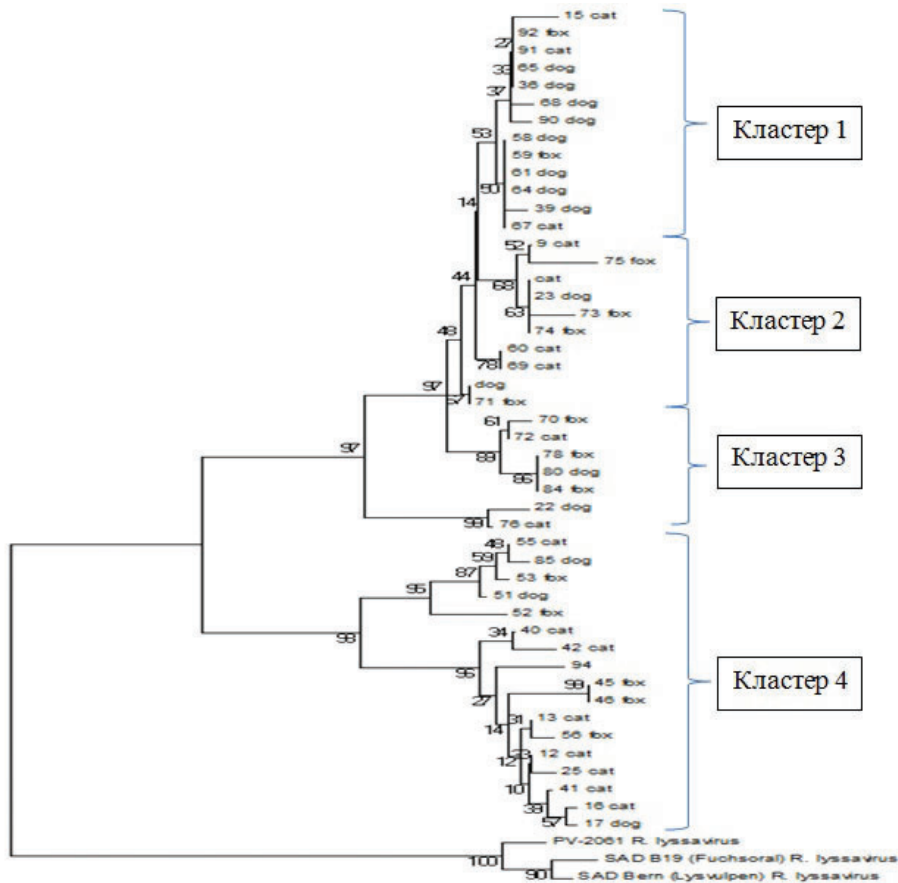


Рис. 1. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вакцинних штамів і вуличних ізолятів вірусу сказу з території України, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій

За результатами філогенетичного аналізу, дослідні ізоляти були розподілені на 4 кластери. При здійсненні картографії встановлено певну приуроченість за географічними зонами та областями:

- 1 кластер – Житомирська, Вінницька, Хмельницька, Київська області;
- 2 кластер – Львівська, Рівненська, Івано-Франківська області;
- 3 кластер – Львівська, Рівненська, Тернопільська, Чернівецька області;
- 4 кластер – Чернівецька, Миколаївська, Черкаська, Запорізька, Київська, Харківська, Херсонська області та АР Крим (Рис. 2.).

На території правобережної України переважають ізоляти, які належать до першого, другого та третього кластерів, четвертий кластер циркулює на території лівобережної України, захоплюючи правобережну частину Київської, Черкаської і Миколаївської областей. Циркуляція двох різних кластерів на території однієї області, на нашу думку може бути пов'язано із сусіднім розташуванням областей, природною міграцією диких тварин, а також із перевезенням тварин з однієї області в іншу.

Отже, незважаючи на високий ступінь генетичної однорідності вірусу сказу, який циркулює на території України, є відмінності між ізолятами за географічним розподілом.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. За результатами молекулярно-генетичних досліджень 47 зразків вірусу сказу від м'ясоїдних тварин (лисиці, коти та собаки) з території України, встановлено їхню приналежність до I-ої філогрупи 1-го генотипу ліссавірусів тварин.

2. За результатами філогенетичного аналізу, проведено розподіл ізолятів вірусу сказу на чотири кластери та встановлено географічну приуроченість.



Рис. 2. Розподіл кластерів вірусу сказу на території України

Подяка. Керівнику і співробітникам департаменту вірусології Національного ветеринарного інституту м. Пулави (Польща): Prof. Jan F. Żmudziński; Dr. Hab. Marcin Smreczak; Dr. Anna Orłowska.

Список літератури

1. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 931 // WHO. – 2005. – P. 121.
2. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 982 // WHO. – 2013. – P. 13–19.
3. Гридько А.І. Роль диких тварин у поширенні сказу / А.І. Гридько // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 3(205). – С. 37–38.
4. Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses / Fauquet, C.M., Mayo, M., Maniloff, J. [et al.]. // Virology Division International Union of Microbiological Societies. – 2005. – P. 1259.
5. Kaplan M. Laboratory techniques in rabies / M. Kaplan, H. Koprowski. – Geneva: WHO, 1996. – 476 p. – [4th ed.].

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF ISOLATES STREET RABIES VIRUS ISOLATED FROM DOMESTIC AND WILD CARNIVORES FROM UKRAINE

Mazur M. V., Polupan I. M.

Institute of Veterinary Medicine The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The goal of the work. Conduct phylogenetic analysis of rabies virus isolates from Ukraine using molecular genetic techniques.

Materials and methods. The paper uses 47 pathological material received from three species from 14 regions of Ukraine in the period 2009–2012.

For statement RT-PCR, used oligonucleotide primers complementary to N-gene rabies virus JW6DPL and JW12.

RNA extraction conducted test system QIAampViral RNA MiniKit according to manufacturer instructions.

Amplification products were purified using a commercial set (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN).

Purified amplicon sequencing in both directions using HELICON «Applied Biosystems ABIPRISM» and BigDye Sequencing Kit (Applied Biosystems) GeneScan for analysis software.

Nucleotide sequences were aligned using Clustal W and visualized for BioEdit v.7.0.5.3.

Analysis of sequencing was performed using electronic software package MEGA6.06.

Results of research and discussion. Staging RT-PCR also confirmed the presence of rabies virus genetic material in all samples of pathological material.

After a detailed analysis evolutionary divergence found that the street isolates by their genetic characteristics uniform, belong to the 1st phylogroups 1st genotype lyssavirus animals.

In the right-bank Ukraine dominated isolates belonging to the first, second and third clusters, cluster fourth circulating on the territory of left-bank Ukraine, capturing the right bank of Kyiv, Cherkasy and Mykolaiv regions.

Thus, despite the high degree of genetic homogeneity of the rabies virus, which circulates in Ukraine, there are differences between isolates geographic distribution.

Conclusions and prospects for further research.

1. Based on the molecular genetic studies of rabies virus samples 47 of carnivorous animals (foxes, cats and dogs) from Ukraine, found they were assigned to and the 1st phylogroups 1st genotype lyssavirus animals.

2. According to the results of phylogenetic analysis, conducted distribution of rabies virus isolates into four clusters and set geographical affiliation.

Gratitude. Managers and employees of the Department of Virology of the National Veterinary Institute. Pulawy (Poland): Prof. Jan F. Żmudziński; Dr. Hab. Marcin Smreczak; Dr. Anna Orłowska.

Keywords: rabies, street isolates, phylogenetic analysis