

УДК 578.8:578.835.11/636.4

**КОНСТРУЮВАННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ
ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ
ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТЕШОВІРУСІВ ТА
ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ А І В****¹Головко А.М., ²Дерев'янюк С.В., ²Бова Т.О., ²Сорока В.І.,
³Кацімон В.В.**¹Українська академія аграрних наук,
вул. Суворова, 9, м. Київ, 01010, Україна²Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна³Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна
E-mail: biopreparat@mail.ru

*Розроблено видоспецифічні праймери для встановлення таксономічного положення штамів вірусів видів *Porcine Teschovirus*, *Porcine Enterovirus A*, *Porcine Enterovirus B*. Проведено рекласифікацію 10 штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України. Згідно міжнародної класифікації їх віднесено до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus*. Проведені дослідження є підґрунтям для розробки вітчизняних діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів.*

*Ключові слова: *Porcine Teschovirus*, *Porcine Enterovirus A*, *Porcine Enterovirus B*, штам, праймери, полімеразна ланцюгова реакція, рекласифікація.*

У 60-х роках ХХ століття встановлено основні морфологічні, біологічні, фізико-хімічні та антигенні властивості ентеровірусів свиней, які лягли в основу їх міжнародної класифікації. В 1971 р. на основі результатів вивчення антигенних властивостей 72 європейських, американських та японських штамів ентеровірусів свиней, Dunne H. et al. [1] розподілили їх на 8 серотипів (ЕВС 1-8), яку доповнили Knowles N. et al. [2] 3-ма (ЕВС 9-11), J. Auerbach et al. [3, 4] – 2-ма (ЕВС 12 і 13) новими серотипами. Крім того, Романенко В.П. з співавт. [5] встановили 14 нових серотипів ЕВС, які поки що не увійшли до міжнародної класифікації.

Нами та іншими дослідниками виділено ентеровіруси свиней, які в реакції нейтралізації вірусу мають міжтипові антигенні властивості, що ускладнює встановлення їх таксономічного положення на рівні серотипу [6].

По мірі накопичення даних щодо генетичної структури вірусів на 11 Міжнародному конгресі з вірусології, який відбувся у 1999 році у Сідней, було прийнято ряд змін щодо таксономії і номенклатури пікорнавірусів [7].

Найбільш суттєвих змін зазнав рід *Enterovirus*, зокрема ентеровіруси свиней. На основі генетичних досліджень, проведених Zell R. et al., [8], Kaku Y. et al. [9] та Doherty M. et al. [10], Міжнародний комітет з таксономії рекласифікував ентеровіруси свиней на 3 види, які віднесено до 2 родів.

Так, ЕВС 1-7, 11-13 серотипів та один новий серотип [8] віднесено до виду *Porcine Teschovirus* (PTV), який на сьогодні налічує 11 серотипів і винесений в окремий рід *Teschovirus*. Назва роду походить від назви самої хвороби свиней (Тешенської хвороби), яку можуть викликати представники цього роду. Ентеровіруси свиней 8 серотипу рекласифіковано як *Porcine Enterovirus A* (PEV-A), а 9 та 10 – як *Porcine Enterovirus B* (PEV-B), які віднесені до роду *Enterovirus*.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН має значний досвід щодо виділення та ідентифікації тешо- і ентеровірусів свиней. Роботи за цим напрямом розпочались у 1961 р. За цей час співробітниками інституту ідентифіковано сотні монотипних і поліантигенних штамів, віднесено до відомих і нових серотипів [5, 11-13]. За серотиповою належністю 15,5 % виділених вірусів мають антигенні зв'язки з референтними штамми одного із серотипів ЕВС, 10,2 % – двох, 66,8 % – 3-18 серотипів, а 7,6 % не мають таких зв'язків із жодним з відомих серотипів ЕВС [11]. В Інституті створено колекцію тешо-, ентеровірусів свиней, яка налічує 92 штами, серед яких є еталонні, вакцинні, діагностичні, прототипні.

Таким чином, у зв'язку зі змінами, внесеними Міжнародним комітетом з таксономії вірусів, існує необхідність у проведенні молекулярно-генетичної рекласифікації штамів, виділених на території України, та впровадження у практику ветеринарної медицини діагностичних засобів, розроблених на основі генетичних методів.

Враховуючи вищенаведене, метою наших досліджень було розробити видоспецифічні праймери тешо- і ентеровірусів свиней для проведення молекулярно-генетичної рекласифікації ентеровірусів свиней та ідентифікації ізолятів вірусів.

Матеріали і методи. В роботі використано 10 штамів (П 642, Б 652, Ч 2372, И 59, Р 501, Г 95, В 151, П 142, М 2323, Д 33) ентеровірусів свиней, що виділені на території України та зберігаються в колекції Інституту; еталонні штами тешо-, ентеровірусів свиней 14 серотипів, люб'язно надані професором Мальте Даубером з колекції Інституту вірусної діагностики ім. Ф. Леффлера Федерального центру вірусних хвороб тварин Німеччини (табл. 1). Штам ЗКСМ вірусу парагрипу-3, штам К вірусу класичної чуми свиней, штам ВК-1 вірусу діареї великої рогатої худоби, штам ВС-1 вірусу трансмісивного гастроентериту свиней – з колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів.

Підтримання та накопичення вірусів, визначення їх інфекційної активності проводили в культурі клітин нирки ембріону свині (СНЕВ).

Таблиця 1. Еталонні штами тешо-, ентеровірусів свиней

Рід	Вид	Серотип	Назва штаму
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine Teschovirus</i>	PTV-1	Teschen 199
		PTV-2	O 3b
		PTV-3	O 2b
		PTV-4	PS 36
		PTV-5	F 26
		PTV-6	PS 37
		PTV-7	F 43
		PTV-8	UKG 173/74
		PTV-9	VIR 2899/84
		PTV-10	VIR 460/88
		PTV-11	Dresden
<i>Enterovirus</i>	<i>Porcine Enterovirus A</i>	PEV-8	V 13
	<i>Porcine Enterovirus B</i>	PEV-9	UKG 410/73
		PEV-10	LP 54

Підбір гомологічних ділянок геному для конструювання видоспецифічних праймерів проводили за допомогою комп'ютерної

програми Vector NTI за використання бази даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) [14], DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) [15].

Для ефективного використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) розроблені олігонуклеотидні праймери повинні відповідати певним вимогам:

- мати високу специфічність для зв'язування зі строго визначеними ділянками геному;
- мати схожу температуру відпалу й константу зв'язування;
- не створювати жорстких вторинних структур.

Синтез праймерів здійснювали в науково-виробничому підприємстві «ЛПТЕХ» (Росія, м. Москва).

Рибонуклеїнову кислоту (РНК) тешовірусів і ентеровірусів свиней виділяли з досліджуваних проб за використання набору «РНК-сорб-В» (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, м. Москва), в основі якого лежить метод сорбції на силікагелі. З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції (ЗТ). ПЛР проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі «Терцик» НВФ «ДНК-Технологія» (Росія, м. Москва), по Saiki R. et al. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 ммоль MgCl_2 , 0,01 % твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 2 нмоль кожного з специфічних праймерів, 2 од. Таq-полімерази, 5 мкл зразків виділеної ДНК. Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію (помноження) специфічних ділянок кДНК інфекційних агентів проводили за програмами, представленими в табл. 2.

Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявністю (або відсутністю) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром відносно фрагментів стандартних маркерів.

Для визначення специфічності сконструйованих праймерів використовували вірусомісну суспензію культури клітин з титром тешо- і ентеровірусів свиней $5,0-8,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{cm}^3$,

вірусовмісні суспензії головного та спинного мозку з титром 2,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³, віруси інших таксономічних груп (вірус парагрипу-3, вірус класичної чуми свиней, вірус діареї великої рогатої худоби, вірус трансмісивного гастроентериту свиней), суспензії культури клітин СНЕВ, спинного і головного мозку, селезінки, легень свиней.

Таблиця 2. Температурні і часові параметри ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації, °С			Час, хв.	Кількість циклів
	тешовіруси свиней	ентеровіруси свиней А	ентеровіруси свиней В		
1	95	95	95	5	1
2	94	94	94	1	5
	58	58	60	1	
	74	74	74	1	
	94	94	94	0,5	
3	58	58	60	0,5	35
	73	73	73	0,5	
	72	72	72	5	
4	72	72	72	5	1
5				зберігання	

Результати та їх обговорення. У результаті аналізу геномів ентjero- і тешовірусів свиней за використання програми «Align X (Vector NTI Suite)» і баз даних GenBank, EMBL, DDBJ було підбрано консервативні ділянки геномів, придатні для розробки видоспецифічних праймерів. Так, для тешовірусів свиней розроблені праймери мали наступні послідовності:

Sense Primer: TeschoF51 5'-CCAGCAGCCTCTGTTCAGAAAG

Antisense Primer: TeschoR51 5'-GC(A/G)TACTTGTATGAGGCCCATC

Вони фланкують ділянку молекули РНК довжиною 650 нуклеотидних залишків, починаючи з 5271 по 5908 нуклеотид (AF296096). Їх ідентичність для всіх тешовірусів свиней за результатами аналізу даних банку генів становила 100 % (95,5 %).

Для ідентифікації ентjeroвірусів свиней А були отримані наступні праймери, які фланкують ділянку геному вірусу з 3141 по 3598 нуклеотиди (AF406813), довжиною 458 нуклеотидних залишка:

Sense Primer: Pev8F6 5'-TGCCAAACTAAGAACGCCACTG
Antisense Primer: Pev8R6 5'-TCACCTTCTGCCATCCACAATC

Їх ідентичність для штамів ентеровірусів свиней А становила 100 %.

Для ідентифікації ентеровірусів свиней В були синтезовані наступні праймери:

Sense Primer: Pev9F1 5'-GGATTGCGGTCAAGCACTTCTGTT
Antisense Primer: Pev9R1 5'-CGTGGTTAGGATTAGCCGCATTC

Вони були підібрані до ділянки геному ентеровірусів свиней В у межах 187 – 513 нуклеотидів (AF363453), розмір ПЛР-фрагменту – 327 нуклеотидних залишка. Ідентичність ініціюючого праймера становила 100 % (95,8 %), а термінуючого праймера – 100 %.

Для визначення специфічності праймерів проведено молекулярно-генетичні дослідження еталонних штамів тешовірусів та ентеровірусів свиней А і В, штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України, вірусів інших таксономічних груп, зразки культури клітин СНЕВ, органів і тканин свиней у полімеразній ланцюговій реакції (табл. 3).

Встановлено, що праймери, отримані до ділянки РНК тешовірусів свиней, були специфічними як до РНК еталонних штамів тешовірусів, так і до РНК усіх тестованих штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України. Праймери, одержані до ділянки РНК ентеровірусів свиней А, взаємодіяли лише з РНК штаму V13, а праймери, сконструйовані для ідентифікації ентеровірусів свиней В – з штамми UKG 410/73 та LP54.

Жодна з досліджуваних пар праймерів не вступала у взаємодію з РНК вірусів інших таксономічних груп. Продуктів ампліфікації з культурою клітин СНЕВ та суспензіями органів свиней також не спостерігали. Отже, встановлена висока специфічність одержаних праймерів, підтверджена їх видоспецифічність. Встановлено таксономічне положення 10 штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України, які на підставі проведених досліджень рекласифіковано як *Porcine Teschovirus* згідно з міжнародною класифікацією.

Отримані дослідження відкривають перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів з використанням розроблених олігонуклеотидних праймерів.

Таблиця 3. Специфічність сконструйованих праймерів

Зразок	Праймери до		
	PTV	PEV-A	PEV-B
PTV-1 Teshen 199	+	-	-
PTV-2 03b	+	-	-
PTV-3 02b	+	-	-
PTV-4 PS36	+	-	-
PTV-5 F26	+	-	-
PTV-6 PS37	+	-	-
PTV-7 F43	+	-	-
PTV-8 UKG 173/74	+	-	-
PTV-9 VIR 2899/84	+	-	-
PTV-10 VIR461/88	+	-	-
PTV-11 Dresden	+	-	-
PEV-A V13	-	+	-
PEV-B UKG 410/73	-	-	+
PEV-B LP54	-	-	+
ЕВС П 642	+	-	-
ЕВС Б 652	+	-	-
ЕВС И 59	+	-	-
ЕВС Г 95	+	-	-
ЕВС В 151	+	-	-
ЕВС П 142	+	-	-
ЕВС Р 501	+	-	-
ЕВС Ч 2372	+	-	-
Суспензія головного мозку ЕВС Ч 2372	+	-	-
Суспензія головного мозку ЕВС М 2323	+	-	-
Суспензія спинного мозку ЕВС Д 33	+	-	-
Вірус парагрипу-3 штамп ЗКСМ	-	-	-
Вірус класичної чуми свиней штамп К	-	-	-
Вірус діареї великої рогатої худоби штамп ВК-1	-	-	-
Вірус трансмісивного гастроентериту свиней штамп ВС-1	-	-	-
Головний мозок	-	-	-
Спинний мозок	-	-	-
Легені	-	-	-
Селезінка	-	-	-
Культура клітин СНЕВ	-	-	-

Таким чином, створено видоспецифічні праймери для проведення молекулярно-генетичної ідентифікації *Porcine Teschovirus*, *Porcine Enterovirus A*, *Porcine Enterovirus B* у зворотній транскриптазній полімеразній ланцюговій реакції. Рекласифіковано 10 штамів ентеровірусів свиней, виділених в Україні. За результатами молекулярно-генетичних досліджень їх віднесено до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus* згідно з міжнародною класифікацією.

1. Dunne H.W. Classification of North American porcine Enteroviruses: a comparison with European and Japanese strains /Dunne H.W., Wang T.J., Ammermann E.H. //Infect. Immunol. – 1971. – Vol. 4, № 5. – P. 619-631.

2. Knowless N.J. Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes /Knowless N.J., Buckley L.S., Pereira H.G. //Arch. Virol. – 1979. – Vol. 62, № 3. – P. 201-208.

3. Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes /Auerbach J., Prager D., Neuhaus S. [et al.] //J. vet. Med. Ser. B. – 1994. – Vol. 41, № 4. – P. 277-282.

4. Auerbach J. Serologische Klassifizierung porziner Enterovirus Feldisolate aus Schweinen mit zentralnervösen Störungen mittels Neutralisationstest und indirekter Immunfluoreszenz und Beschreibung von zwei neuen Serotypen (PEV12 und PEV13) /Auerbach J. //Fachbereich Veterinarmedizin, Justus-Liebig-Universität. – Giessen, 1993. – P. 12.

5. Класифікація ентеровірусів свиней /Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бабич Н.В. [и др.] //Вісник аграрної науки. – 1993. – № 1. – С. 94-101.

6. Дерев'яно С.В. Рекombінація і її значення в еволюції ентеровірусів свиней /Дерев'яно С.В., Полевик О.І., Сорока В.І. //Мат. наук.-практич. конф. молодих вчених аграріїв Чернігівщини [«Наукове обґрунтування сталого розвитку агроекологічних систем Чернігівщини в ринкових умовах і обмеженого ресурсного забезпечення»]. – Чернігів : ІСГМ, 1999. – С. 32-35.

7. Picornaviridae /King A.M.Q., Brown F., Christian [et al.] //Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses /eds Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. – New-York ; San Diego : Academic Press, 2000. – P. 657-673.

8. Porcine Teschovirus comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects /Zell R., Dauber M., Krumbolz A. [et al.] //J. Virol. – 2001. – Vol. 75, № 4. – P. 1620-1631.

9. Kaku Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses /Kaku Y., Sarai A., Murakami Y. //J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 417-424.

10. Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate:

relationships with other picornaviruses /Doherty M., Todd D., McFerran N., Hoey E.M. //J. Gen. Vir. – 1999. – Vol. 80. – P. 1929-1941.

11. Сорока В.І. Характеристика ентеровірусів, виділених від свиней /Сорока В.І., Полев'як О.І., Дерев'яно С.В. //Ветеринарна медицина: міжвідом. темат. наук. зб. – Харків, 2003. – Вип. 82. – С. 531-535.

12. Дерев'яно С.В. Класифікація ентеровірусів свиней: сучасний стан та проблеми /Дерев'яно С.В., Сорока В.І. //Ветеринарна медицина: міжвідом. темат. наук. зб. – Харків, 2002. – Вип. 80. – С. 195-200.

13. Визначення таксономічного положення штамів тешо-, ентеровірусів свиней, виділених на території України /Дерев'яно С.В., Сорока В.І., Бокун А.О., Бова Т.О. //XII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доп. (м. Ужгород, 25-30 травня 2009 р.). – Ужгород: Патент, 2009. – С. 423.

14. European Molecular Biology Laboratory. – Режим доступу: <http://www.embl.org/>

15. DNA Data Bank of Japan (DDBJ). – Режим доступу: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТЕШОВИРУСОВ И ЭНТЕРОВИРУСОВ СВИНЕЙ А И В

¹Головко А.Н., ²Дерев'яно С.В., ²Бова Т.А., ²Сорока В.І., ³Кацимон В.В.

¹Украинская академия аграрных наук, г. Киев

²Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

³Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, г. Киев

Сконструированы видоспецифические праймеры для определения таксономического положения штаммов видов Porcine Teschovirus, Porcine Enterovirus A, Porcine Enterovirus B. Проведена реклассификация 10 штаммов энтеровирусов свиней, выделенных на территории Украины. В соответствии с международной классификацией они отнесены к роду Teschovirus виду Porcine Teschovirus. Проведенные исследования создают основу для разработки отечественных диагностических тест-систем на основе молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: Porcine Teschovirus, Porcine Enterovirus A, Porcine Enterovirus B, штамм, праймеры, полимеразная цепная реакция, реклассификация.

**CONSTRUCTION OF SPECIES-SPECIFIC PRIMERS
FOR MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF
PORCINE TESCHOVIRUSES AND ENTEROVIRUSES
A AND B**

**¹Golovko A.N., ²Derevyanko S.V., ²Bova T.O., ²Soroka V.I.,
³Katsymon V.V.**

¹Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kyiv

²Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

³State Scientifically-Control Institute of Biotechnology and Strains
Speeches of Microorganisms, Kyiv

The species-specific primers for identification of taxonomic positions of strains of Porcine Teschovirus, Porcine Enterovirus A and Porcine Enterovirus B kinds were developed. The reclassification of 10 strains of Porcine Enterovirus isolated in Ukraine was performed. In conformity to the international classification they were referred to the Teschovirus genus of Porcine Teschovirus specie. Performed investigations had created a basis for elaboration of domestic molecular-genetic diagnostic test systems.

Key words: Porcine Teschovirus, Porcine Enterovirus A, Porcine Enterovirus B, strains, primer, polymerase chain reaction, reclassification.