

Din datele înscrise din tabelele 4 și 5 rezultă o concordanță bună între antigenele hemaglutinante H5 și cele de grup preparate în cadrul acestui studiu și cele standard.

CONCLUZII

1. S-a preparat antigen hemaglutinant (H5) cu titrul de 1/128-1/256.
2. Antigenul de grup folosit în testul ID a fost preparat din m.c.a.
3. Serul pozitiv anti H5 obținut în lucrare a avut titrul inhihohemaglutinant de 1/2048-1/4096.
4. Reagenții preparați (antigene și ser pozitiv anti H5) s-au dovedit a fi comparabili ca sensibilitate și specificitate cu cei standard.

BIBLIOGRAFIE

1. NGUYEN DC, UYEKI TM, JADHAO S, MAINES T, SHAW M, MATSUOKA Y, SMITH C, ROWE T. *Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001* Journal of Virology, April 2005.
2. xxx Centers for Diseases Control and Prevention: USA Avian Influenza Infection, 2005.
3. xxx World Organization for Animal Health (OIE) (2005). Chapter 2.7.12 Avian Influenza. In: *Terrestrial Animal Health Manual, Fourteenth Edition. OIE, Paris, France (In Press)*.
4. xxx WHO Writing Committee of WHO Consultation of Human Influenza A/H5. The New England J. of Med., 2005.

STUDIUL VARIABILITĂȚII GENETICE A VIRUSULUI RABIC SEROTIPUL 1 ÎN ROMÂNIA

M. TURCITU ¹⁾, Handan COSTE ¹⁾, GH. BĂRBOI ¹⁾,
T. MULLER ²⁾, C. FREULING ²⁾, N. JOHNSON ³⁾,
Florina DUMITRESCU ¹⁾, V. VUȚĂ ¹⁾,
Monica VANGHELE ¹⁾, Raluca CIORANU ¹⁾, R. MOȚIU ¹⁾

REZUMAT

Analiza secvențelor de nucleotide pentru izolatele de virus din diferite zone geografice ale României permite decelarea diversității filogenetice a acestora într-o anumită zonă, precum și gradul de înrudire cu izolatele din diferite țări europene. Secvențierea genomului viral s-a realizat la nivelul genei nucleoproteinei, datorită gradului relativ mare de conservare genetică de la acest nivel, materialul patologic fiind reprezentat de omogenate de creier de la diverse specii de animale domestice și sălbatice (2 câini, 3 pisici, 1 șacal, 3 vulpi, 3 bovine, 1 cabalină, 1 ovină) diagnosticate cu rabie prin imunofluorescență directă și bioprobă pe șoareci. Astfel, datele obținute prin această metodă completează cu succes studiile epidemiologice referitoare la circulația virusului rabic pe teritoriul țării și în relația cu țările învecinate, cu posibilitatea stabilirii profilului epidemiologic molecular al tulpinilor circulante într-un areal dat.

Cuvinte cheie: virus rabic, secvențiere, filogenetic, analiză epidemiologică

GENETIC VARIABILITY ANALYSIS OF RABIES VIRUS SEROTYPE 1 IN ROMÂNIA

ABSTRACT

Nucleotides sequence analysis for virus isolates belonging to different geographical regions of Romania allows phylogenetic diversities screening

- 1) Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală, București
- 2) Institutul de Epidemiologie Friedrich Loeffler – Institutul Federal de Cercetare pentru Sănătate Animală, Wusterhausen, Germania – Laborator de Referință OIE ptr: rabie
- 3) Agenția Laboratoarelor Veterinare, Marea Britanie - Centru colaborator OMS pentru caracterizarea virusului rabic

for a particular region, as well as similarity degree with isolates from different european countries. Viral genome sequencing was performed at nucleoprotein gene region, due to the relatively high genetic stability, with the pathologic material consisting of brain homogenates from different species of domestic and wild animals (2 dogs, 3 cats, 1 jackal, 3 foxes, 3 cows, 1 horse, 1 sheep) find with rabies through direct immunofluorescence and mice inoculation. The data obtained by this method successfully complete the epidemiological studies regarding rabies virus circulation along the country and related to neighboring countries, with the possibility of establishing molecular epidemiological profile of circulating strains for a specific region.

Key words : rabies virus, sequencing, phylogeny, epidemiological analysis.

Lysavirusurile (genul *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*) sunt virusuri ARN cu un genom de aproximativ 12kb, monocatenar, de sens negativ, nesegmentat, care infectează un număr mare de mamifere. Pe baza studiilor de secvențiere și filogenie acestea sunt clasificate în șapte genotipuri. Genotipul 1 cuprinde tulpina clasică de rabie, regăsită la nivel mondial, iar genotipurile 2 - 7 cuprind virusurile înrudite cu rabia (*RRV - Rabies Related Viruses*), anume: virusul Lagos Bat (genotip 2), Mokola (genotip 3), Duvenhage (genotip 4), EBL - *European Bat Lyssavirus 1* și 2 (genotipurile 5 și 6) și ABL - *Australian Bat Lyssavirus* (genotip 7) (2,3).

Genomul virusului rabic codifică cinci proteine și anume nucleoproteina (N), fosfoproteina (P), proteina matrice (M), glicoproteina (G) și polimeraza (L). Toate rhabdovirusurile posedă două componente structurale majore: un nucleu helicoidal compus din ribonucleoproteină și o anvelopă înconjurătoare. La nivelul nucleului, ARN genomic este în contact strâns cu nucleoproteina ; de asemenea, fosfoproteina și polimeraza completează structural această componentă. Glicoproteina formează aproximativ 400 spiculi trimerici distribuiți pe toată suprafața virală, iar proteina M este asociată cu ambele componente (nucleu și anvelopă).

Lucrarea de față și-a propus secvențierea și analiza filogenetică integrată a unor izolate de virus rabic de pe teritoriul României. Pentru analiza prin tehnici moleculare, importanță majoră se acordă genei nucleoproteinei, datorită gradului relativ mare de stabilitate genetică (potențial mutagenic redus) în comparație cu celelalte 4 regiuni, astfel că secvențele obținute de la diverse izolate permit stabilirea exactă a filogeniei (4).

MATERIALE ȘI METODE

Virusul. Materialul supus investigației a fost reprezentat de probe de omogenat creier provenit de la diferite specii de animale domestice și sălbatice din câteva zone ale țării (2 câini, 3 pisici, 1 șacal, 3 vulpi, 3 bovine, 1 cabalină și 1 ovină) diagnosticate ca fiind pozitive prin tehnicile curente: imunofluorescența directă (IFD), inocularea intracerebrală a șoarecilor.

Extracția ARN. Extracția s-a efectuat cu kit-uri specifice - "QIAmp Viral RNA Mini Kit - QIAGEN", conform protocolului recomandat de producător, prin utilizarea a 200μl supernatant probă și eluția ARN în 50 μl volum final.

Reacția RT-PCR (amplificarea segmentului de nucleotide specific). Reacția RT-PCR (*Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction*) se bazează pe obținerea de ADNc (ADN copie) având ca matriță ARN-ul viral, după care se recurge la amplificarea exponențială a segmentului de ADNc dorit, astfel că la sfârșitul reacției se obține un număr mare de catene (de ordinul miliardelor) de dimensiuni specifice. Pe scurt, reacția are la bază folosirea unor secvențe de nucleotide (18-20 nucleotide) complementare unei anumite regiuni a catenei virusului rabic (care poartă denumirea de primeri - sens și antisens), a enzimelor necesare desfășurării reacției - respectiv revers transcriptaza (*Omniscript, Sensiscript-Qiagen*) și ADN polimeraza (*Hot Start Taq Polymerase-Qiagen*), a unui amestec de nucleotide în concentrație cunoscută (mix de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), inhibitori de RN-aze endogene (*RNasin- Promega*), tampon de reacție (cu rol stabilizator și catalizator) și apă ultrapură pentru aducerea mix-ului de reacție la concentrația finală. Ulterior, în mix-ul de reacție este introdus un volum de 5μl ARN (100-200 ng ARN).

Primerii folosiți au fost selecționați de la nivelul genei nucleoproteinei, cu obținerea unui fragment final de 606 perechi de baze (5). Ulterior, amestecul de reacție este supus inițial incubării la 50°C - revers-transcripție (temperatura optimă pentru activitatea *Omniscript* și *Sensiscript-Qiagen*) cu obținerea de ADNc, urmează o incubare la 95°C timp de 15 minute (denaturare inițială și activarea ADN polimerazei) după care au loc modificări ciclice ale profilului termic (de obicei 35-40 cicluri) : 95°C- denaturare (separarea celor două catene ale ADN), 55°C - aliniere (atașarea primerilor de catena matriță), 72°C - extensie (adăugarea complementară de nucleotide și extensia catenei nou-formate).

Electroforeza. Pentru vizualizarea benzilor specifice se apelează la electroforeza în gel de agaroză, cu identificarea fragmentelor de interes pe baza dimensiunilor specifice (6). În continuare, ampiconii sunt supuși unui proces de purificare din gelul de agaroză, folosind kit-ul "MiniElute Gel Extraction Kit -

Qiagen'', conform protocolului recomandat de producător.

Reacția PCR pentru secvențiere. Principiul reacției : spre deosebire de reacția clasică de PCR, mix-ul de reacție diferă prin existența nucleotidelor marcate fluorescent (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP – di-deoxinucleotide), care se deosebesc de nucleotidele obișnuite prin lipsa grupării hidroxil (-OH) la poziția 3' (denumite astfel și nucleotide "STOP", deoarece după inserarea acestora la nivelul catenei reacția încetează), astfel că la final se obțin catene de ADN care diferă printr-o singură nucleotidă și anume cea fluorescentă. Totodată, fiecare din cele patru baze azotate este marcată cu un anumit fluorocrom, care emite semnalul fluorescent la o lungime de undă specifică. De asemenea, se folosește un singur primer pentru fiecare reacție. Pentru reacția de PCR s-a folosit kit-ul "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit- Applied Biosystems" – protocolul recomandat de producător, cu temperatura de aliniere 55°C.

Purificarea ampicionilor rezultați s-a efectuat pe colonie de purificare (Centri-Sep Columns-Princeton Separations)- protocolul recomandat de producător, urmată de precipitarea (obținerea peletelor) acizilor nucleici cu etanol și resuspendarea acestora în reagentul de secvențiere (TSR sau Hi-Di Formamide - Applied Biosystems).

Secvențierea acizilor nucleici. Principiul reacției: se bazează pe supunerea fragmentelor de ADN de mărimi diferite la electroforeză în poliacrilamidă (POP 6, POP 4 - Applied Biosystems), cu separarea acestora în funcție de dimensiuni, citirea automată a fluorescenței și transpunerea acesteia sub formă de "peak-uri" pe grafic (Fig. 1). În funcție de lungimea de undă citită de aparat, peak-ul va corespunde uneia din bazele azotate ale ADN.

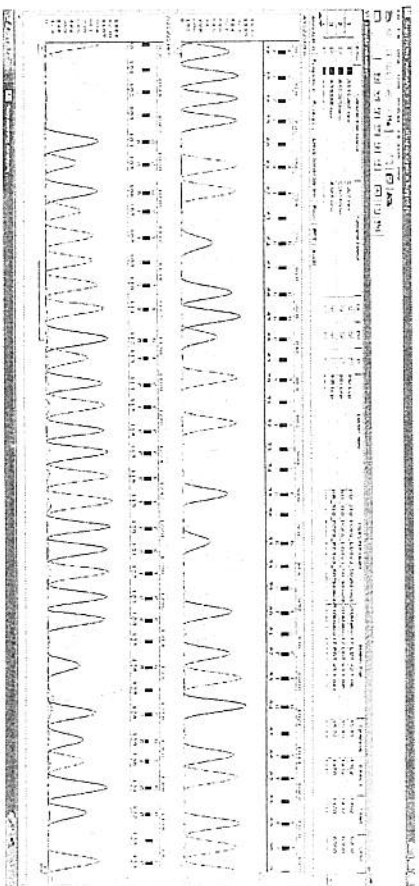
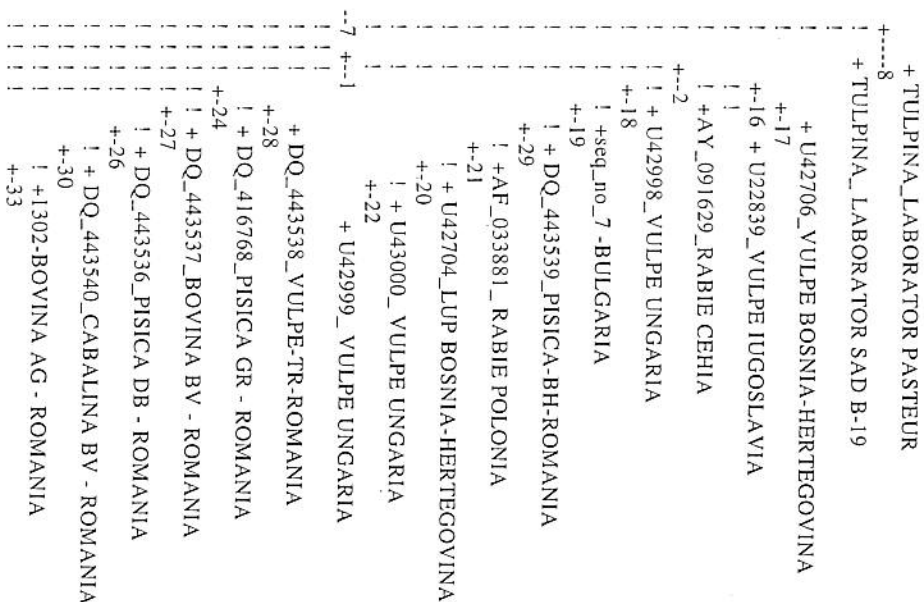


Fig. 1 - Citirea, interpretarea și prelucrarea secvențelor de nucleotide

Datele obținute au fost comparate atât între ele cât și cu secvențe virale din diferite țări europene preluate din GeneBank, folosind programe dedicate pentru alinierea acestora. (BioEdit Sequence Alignment Editor - Isis Pharmaceuticals Company Inc, ClustalW Multiple Alignment). Lungimea finală a fragmentelor analizate a fost de 313 perechi de baze. (7). Ulterior, pe baza similitudinii, s-a întocmit arborele filogenetic, cu evidențierea gradului de înrudire dintre secvențele analizate (Fig. 2) (1).

Fig. 2. Arborele filogenetic :



imagini de ansamblu referitoare la circulația virusului pe teritoriul României. Tot în acest sens, secvențierea unor fragmente de dimensiuni mai mari ar putea fi relevantă pentru filogenie, cu toate că, datorită diversității genetice constatate pentru fragmentele analizate, nu pare să fie un factor hotărâtor.

CONCLUZII

1. Pentru prima dată în România s-a realizat un studiu de epidemiologie moleculară al unor tulpini de virus rabic.
2. S-a realizat patentarea și recunoașterea internațională a 8 secvențe de virus rabic, urmând a definiția procedura și pentru restul secvențelor obținute.
3. Gruparea filogenetică a tulpinilor de virus rabic a fost în relație cu regiunea geografică și nu cu specia de animal afectată.
4. Datele înregistrate au facilitat identificarea ariei de circulație a virusului rabic în România și în țările vecine.

BIBLIOGRAFIE

1. BACHIR KISSI, NOEL TORDO, HERVE BOURHY(1995). Genetic Polymorphism in the Rabies Virus Nucleoprotein Gene, *Virology*, 209, 537.
2. BOURHY H., KISSI B., TORDO N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus, *Virology*, 194, 70-81.
3. HERVE BOURHY, BACHIR KISSI, LAURENT AUDRY, MARCIN SMRECCZAK, MALGORZATA SADKOW, ANDRYS, KATARINA KULONEN, NOEL TORDO, JAN F. TRINSKI, EDWARD C. HOLMES(1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe, *Journal of General Virology*, 80, 2545-2557.
4. JOHNSON N., VALCHOVSKI R., FOOKS A.R., MEULLER E. (1999). Epidemiology of Rabies in Bulgaria - lucrare nepublicată.
5. PAUL R. HEATON, LORRAINE M. McELHINNEY, J. PALMER (1999). Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR, *Journal of Virological Methods*, 81, 1-10.
6. SACRAMENTO D., BOURHY H. TORDO N. (1991). PCR technique for diagnosis of rabies virus, *Molecular and Cellular Probes*, 6, 229-240.
7. THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. (1994). Clustal W: a package for performing rapid sequence alignment on a microcomputer, *Gibson T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*, *Nucleic Acid Research*, 22, 4673-4680.

OPTIMIZAREA TESTULUI DE VIRUSNEUTRALIZARE CU ANTICORPI FLUORESCENȚI PENTRU EVALUAREA NIVELULUI DE ANTICORPI ANTIRABICI POSTVACCINALI

Florina DUMITRESCU¹⁾, Gh. BĂRBOI¹⁾,
Șt. NICOLAE¹⁾, Irina PLĂMĂDEALĂ¹⁾, V. VUȚĂ¹⁾,
Florence CLIQUET²⁾, Marine WASNIEWSKY²⁾

REZUMAT

Au fost stabiliți parametri optimi ai testului de virusneutralizare cu anticorpi fluorescenți (FAVN), folosind reagenți standard internaționali: virus rabic - tulpina CVS cultivată pe linia celulară BHK-21 C-13, ser pozitiv OIE (6,7UJ), ser negativ OIE. Optimizarea testului FAVN realizat, a fost validată de către Laboratorul Internațional de Referință pentru Rabie AFSSA, Nancy, Franța. Verificarea în condiții de teren a testului FAVN s-a efectuat prin testarea de seruri provenite de la câini vaccinați și nevaccinați, seruri de la vulpi vaccinate cu momele vaccinale și seruri de la oameni vaccinați antirabic. Toate serurile (60) au fost testate în paralel și prin testul imunoenzimatic (ELISA).

Probele provenite de la subiecți vaccinați, au avut în toate cazurile valori (FAVN) de peste 0,5 UI/ml ser (nivel protector), iar cele provenite de la nevaccinați au fost negative. S-a înregistrat o concordanță de 100 % între cele două teste folosite.

Cuvinte cheie: FAVN, anticorpi, vaccinare, virus rabic

OPTIMIZATION OF THE FLUORESCENT ANTIBODY VIRUS NEUTRALIZATION TEST FOR EVALUATING THE LEVEL OF POSTVACCINAL RABIES ANTIBODIES

ABSTRACT

The optimal parameters of the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) have been established using international standard reagents: rabies virus - CVS strain grown on the BHK-21 C-13 cell line, OIE (6,7 I.U.) positive serum and OIE negative serum.

1) Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală București, str. Dr. Stăicovici, nr.63

2) Laboratorul Internațional de Referință OIE pentru Rabie, AFSSA - Nancy, Franța