

**Oligonukleotydy, sekwencja nukleotydowa  
fragmentu  
genu białka fuzyjnego F wirusa Newcastle Disease (NDV), zastosowanie sekwencji nukleotydowej do detekcji i różnicowania odmiennych  
szczepów NDV**

Przedmiotem wynalazku są oligonukleotydy, konserwowana sekwencja nukleotydowa wchodząca w skład genu kodującego białko fuzyjne wirusa rzekomego pomoru drobiu (Newcastle Disease Virus, NDV, APMV-1), zastosowanie sekwencji nukleotydowej do detekcji i różnicowania szczepów NDV.

Ogólnie wynalazek dotyczy wykrywania i różnicowania odmiennych szczepów NDV w naturalnych warunkach ich występowania.

Przedmioty wynalazku służą do stosowania zdegenerowanych oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji genu białka fuzyjnego F przy wykrywaniu i różnicowaniu wirusa rzekomego pomoru drobiu w wymazach z układów oddechowego i/lub pokarmowego ptaków.

Choroba rzekomego pomoru drobiu wywoływana jest przez wirusa APMV-1 (*ang.* Avian Paramyxovirus Type 1) należącego do rodziny *Paramyxoviridae*, rodzaju *Avulavirus* (Mayo 2002).

Wiriony *Paramyxoviridae* mają złożoną budowę zawierającą otoczkę lipidową, warstwę białkową oraz nukleokapsyd. Cząsteczki przyjmują zazwyczaj kształt od sferycznego do pleomorficznego, a ich wymiary wahają się w granicach 150-350 nm, przy

czym możliwe jest również występowanie form filamentowych o długości dochodzącej do 10000 nm. W dwuwarstwowej otoczce lipidowej zanurzone są dwie glikoproteiny powierzchniowe – NH oraz F, które wznoszą się ponad powierzchnię błony na wysokość od 8 nm do 12 nm, formując homooligomery. Tuż pod otoczką znajduje się jednolita warstwa zbudowana z białka M (matrix), a pod nią nukleokapsyd złożony głównie z białka NP (również L, P), który chroni jedno niciowe RNA (ok. 15000 nukleotydów) o ujemnej polarności. Nukleokapsyd ma wydłużony, często pozawijany, kształt o długości 600-800 nm i szerokości 13-18 nm i charakteryzuje się budową helikalną ze skokiem od 5,5 nm do 7 nm. Jest on zdolny do przeprowadzenia pierwszej transkrypcji, dzięki czemu uważa się go za najmniejszy infekcyjny fragment wirusa (Compans et al. 1967, Takimoto et al. 2004). Genom NDV koduje sześć białek: NP (*ang.* nuclear protein), P (*ang.* phosphoprotein), M (*ang.* matrix), F (*ang.* fuzion), L (*ang.* large protein), HN (*ang.* hemagglutinin-neuraminidase).

Geny kodujące białka znajdują się pomiędzy nie kodującymi fragmentami o długości 50 nukleotydów od strony 3' oraz 50 – 161 nukleotydów od strony 5'. Odcinki te pełnią funkcję regulatorową, często określa się je odpowiednio jako sekwencja liderowa i (-)liderowa, które konieczne są do prawidłowego przebiegu procesu transkrypcji i replikacji. Wszystkie geny otoczone są sekwencjami regulatorowymi, podlegającymi procesowi transkrypcji, między którymi znajdują się „introny” o wielkości od 1 do 56 nukleotydów.

Dojrzała cząstka wirusa przedostaje się do organizmu gospodarza poprzez nabłonek układu oddechowego (rzadziej pokarmowego). Za pośrednictwem aktywowanego (dzięki interakcjom z białkiem HN) białka F dochodzi do połączenia błon komórkowych wirusa i gospodarza. Po fuzji, białko M ulega dysocjacji, a helikalny nukleokapsyd przechodzi do cytoplazmy zakażonej komórki. Następuje pierwsza faza transkrypcji, gdzie kompleks białek L-P rozpoczyna proces syntezy mRNA dla białka NP oraz (+)RNA. Na matrycy antygenomu powstaje genomowe (-)RNA, które tak jak (+)RNA zostaje związane przez intensywnie syntetyzowane nukleoproteiny (Vidal i Kolakofsky 1989).

W drugiej fazie replikacji wirusa wzmożone zostają procesy transkrypcji genomowego RNA oraz translacji pozostałych białek. Ponieważ paramyksowirusy posiadają tylko jeden enzym odpowiedzialny za w/w funkcję, to konieczne jest przełączenie trybu działania enzymu za pomocą kofaktora jakim jest fosfoproteina P.

Gdy nagromadzona zostaje odpowiednia liczba białek oraz wirusowego (-)RNA, tworzone są nukleosomy złożone z RNA oraz białek NP, P i L (zwane RNP). Ostatnią fazą cyklu replikacyjnego wirusa rzekomego pomoru jest odpączkowanie dojrzałych cząstek od komórki gospodarza.

Endemicznie choroba Newcastle Disease Virus obejmuje tereny Azji, Afryki, Centralnej i Południowej Ameryki, jednak bardzo łatwo rozprzestrzenia się na inne kontynenty (Alexander 2003). Aktualnie wirus NDV uważany jest, obok wirusa grypy ptaków, za najgroźniejszego patogena ptaków domowych i wirusa, który przynosi największe straty finansowych w hodowli zwierząt. Jako przykład może posłużyć strata miliardów dolarów przez rząd Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej w roku 2002 po wystąpieniu rzekomego pomoru drobiu na terenie stanu Kalifornia (Samal 2004). Dyrektywa Unii Europejskiej nr. 92/66/EEC z 14 lipca 1992 rozszerzona regulacjami nr. 806/2003 z 14 kwietnia 2003 roku oraz dyrektywą nr. 2006/104/EC z 20 listopada 2006, narzuca swoim członkom bezwzględną walkę z zakażeniami rzekomym pomorem drobiu. Potwierdzona obecność zjadliwego wirusa NDV musi zostać zgłoszona inspekcji weterynaryjnej (CD 92/66/EEC).

Angielska nazwa choroby oraz wirusa „Newcastle Disease” wywodzi się od brytyjskiego miasta „Newcastle-upon-Tyne”, nieopodal którego zdiagnozowano ją po raz pierwszy w 1926 roku. Niemal równocześnie w tym samym roku została ona wykryta na wyspie Jawa w Indonezji. Pomimo braku pewności uważa się, że epidemie wysoce patogennej choroby ptactwa domowego w Europie i Azji z połowy XVIII wieku również były spowodowane przez wirusa NDV. Inne prawdopodobne miejsca występowania rzekomego pomoru drobiu to: Węgry w 1912 i Szkocja w 1989. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej NDV izolowany był już od lat 30 XX wieku (Alexander 1988).

Wyróżnia się cztery pandemie APMV-1, z czego nie wszystkie miały zasięg globalny. Pierwsza rozpoczęła się w 1926 roku w hodowlach kurcząt w południowo zachodniej Azji. Rozprzestrzeniła się w postaci dwóch fal, w latach 1926-1942 na terenach Europy i ponownie pod koniec lat czterdziestych i początku pięćdziesiątych na kontynentach europejskim, afrykańskim i w dwóch Amerykach. Tak długi czas potrzebny na rozwój pandemii wynikał z powodu słabo rozwiniętego handlu międzynarodowego oraz II Wojny Światowej (Lancaster 1966, Levine 1964).

Druga pandemia rozpoczęła się pod koniec lat 60-tych na Środkowym Wschodzie i dzięki intensywnemu rozwojowi zarówno hodowli ptaków jak i lotnictwa komercyjnego w ciągu czterech lat rozprzestrzeniła się na całym świecie (Francis 1973). Przyjmuje się, że z powodu stosowania na szeroką skalę szczepionek przeciw NDV, w późnych latach 70-tych rozprzestrzeniła się kolejna, trzecia fala zachorowań (Alexander 2001). została rozpoznana po raz pierwszy na Bliskim Wschodzie pod koniec lat 70-tych (Kaleta et al. 1985). Na początku kolejnego dziesięciolecia ogniska choroby wykrywane były we Włoszech, Belgii i Niemczech. Ze względu na fakt, że za rozprzestrzenianie rzekomego pomoru drobiu odpowiedzialne były gołębie, to Wielka Brytania w 1983 roku wprowadziła całkowity zakaz importu tych ptaków. Pomimo tego posunięcia już rok później zgłaszano infekcje drobiu wysoce zjadliwym wariantem wirusa NDV nazywanym PPMV-1 (eng. Pigeon Paramyxovirus Type 1). Powodem zakażeń była zanieczyszczona odchodami pasza składowana w magazynach, gdzie gnieździły się chore gołębie (Alexander 1984). Do 1985 roku PPMV-1 rozprzestrzenił się na wszystkich kontynentach poza Australią (Cross 1995). W Polsce ostatnie doniesienia o wystąpieniu rzekomego pomoru drobiu pochodzą z roku 1974, a w latach kolejnych izolowano szczepy o mniejszej zjadliwości niepowodujące nasilenia objawów choroby. W latach 1995-2006 w Niemczech, Belgii, Danii, Włoszech, Szwecji i Holandii rozpoznano łącznie 333 ogniska wirulentnego wariantu NDV: 25 wśród komercyjnych hodowli kurczaków, 276 w przydomowych gospodarstwach oraz 32 między innymi ptakami trzymanymi w niewoli (np. gołębie) (EFSA 2007).

Eksperymentalnie udowodniono, że NDV zakaża przynajmniej 236 gatunków z ponad połowy rzędów spośród gromady ptaków. W zależności od gatunku gospodarza oraz wariantu wirusa, choroba rzekomego pomoru drobiu może przebiegać bezobjawowo lub doprowadzić do śmierci ptaków (Kaleta i Baldauf 1988).

Głównym rezerwuarem wirusa APMV-1 są gatunki zwierząt zaliczane do ptaków wodnych oraz wędrownych (Pfitzer et al. 2000, Takakuwa et al. 1998, Ujvari et al. 2003). Ptaki te pomimo zakażeń często nie wykazują objawów klinicznych, co pozwala na „niezauważone” rozprzestrzenienie się wirusa (Alexander 2003). Badania prowadzone w Hiszpanii wśród 18 gatunków ptaków wodnych pokazały, że 1,6% posiadało przeciwciała przeciw NDV (Maldonado et al. 1994). W regionach Kanady rok po epidemii rzekomego pomoru drobiu 50% badanych kormoranów (*Phalacrocorax auritus*) oraz pelikanów (*Pelecanus erythrorhynchos*) było seropozytywne (Wobeser et al. 1993). W przeważa-

jącej większości izolowane szczepy APMV-1 wykazywały się niską wirulencją, jednakże Shengqing i współpracownicy wykazali możliwość zmiany wirulencji wirusów izolowanych z ptaków wodnych poprzez ich pasaż w kurach domowych (Rosenberger et al. 1974, Hlinak et al. 2006, Shengqing et al. 2002). Ważnym z punktu widzenia ekonomicznego gospodarzem dla wirusa mogą być papugi. We wczesnych latach 70-tych egzotyczne ptaki importowane do Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej wywołały epidemię ND, która przyniosła niemal 19 milionów dolarów strat (Werner et al. 1999). Ptaki należące do nadrzędu paleognatyczne (np. strusie, kiwi), rzędu grzebiące (np. przepióry, perlice) oraz gołębiowe również wykazują dużą podatność na infekcje ptasim paramyksowirusem typu pierwszego (Jorgensen et al. 1999). Przyjmuje się, że największa śmiertelność (do około 90%) wśród zakażonych ptaków występuje u kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) (Alexander 2003).

NDV poza atakowaniem ptaków ma też zdolność do infekowania innych zwierząt, w tym ludzi (są to zazwyczaj pracownicy laboratoriów lub osoby przeprowadzające szczepienia), u których wywołuje lekkie zapalenie rogówki. Nie stwierdzono transmisji między ludźmi. Dzięki zdolności do wybiórczego namnażania się wirusa NDV w komórkach rakowych człowieka i stymulacji fibroblastów do produkcji interferonów, rozważa się użycie NDV jako czynnika prowadzącego do remisji niektórych form nowotworów (Sinkovics i Horvath 2000).

W kale zakażonych zwierząt znajdują się ogromne ilości wirusa APMV-1, który wnika do ciał kolejnych ptaków dwoma drogami: wziewną oraz pokarmową. Dodatkowo podczas przebiegu infekcji z powinowactwem do tkanek układu oddechowego wirus jest uwalniany do środowiska w postaci aerozolu, który jest wdychany lub osiada na błonach śluzowych zdrowych osobników (Alexander 1988).

Pomimo około 9-14 dniowego okresu w jakim chory ptak uwalnia wirusa do środowiska, obecność APMV-1 w populacji ptaków może utrzymywać się nawet ponad dwa lata. Świadczy to o tym, że przynajmniej u części zwierząt choroba przechodzi w fazę chroniczną (Kapczynski i King 2005, Samuel et al. 1989).

Szczepy wirusa NDV można podzielić ze względu na patogenność. OIE wyróżnia pięć typów charakteryzujących się innym nasileniem objawów (problemy z utrzymaniem równowagi – upadanie, utrudnione oddychanie, rzęzenie, charczenie, duszności, wyciek z nosa, porażenia układu nerwowego, konwulsje, skręt szyi, anoreksja, letarg,

obrzęk głowy – szczególnie dookoła oczu, wodnista ciemnozielona biegunka) oraz śmiertelnością (Alexander 2003).

Wyróżnia się następujące typy patogenności:

1. welogeniczny wicerotropiczny – śmiertelność na poziomie do 100%, poza ogólnymi objawami zaatakowany zostaje układ krwionośny, co doprowadza do krwotoczności;
2. welogeniczny neurotropiczny – podobna śmiertelność, zapalenie układu nerwowego i/lub oddechowego, brak objawów ze strony układu krwionośnego;
3. mezogeniczny – śmiertelność do 10%, średnio nasilone objawy ze strony układu oddechowego, rzadko nerwowego;
4. lentogeniczny – zazwyczaj wszystkie ptaki przeżywają, brak lub niski poziom objawów ze strony układu oddechowego;
5. asymptotyczny – zakażenie przechodzi bezobjawowo.

Główną przyczyną różnic w zjadliwości poszczególnych szczepów jest sekwencja aminokwasowa w białku F rozpoznawana przez proteiny komórkowe. Poprzez specyficzne miejsca cięcia prekursora białka odpowiedzialnego za fuzję, ogranicza się możliwość namnażania zdolnych do infekcji wirusów do komórek zaopatrzonych w zestaw wymaganych proteaz. Dlatego właśnie wirusy lentogeniczne atakują głównie nabłonek układu oddechowego ptaków, bo tylko tam występują komórki posiadające proteazę podobną do trypsyny. (ang. Trypsin-like proteinase).

Bardzo często osoby diagnozujące chorobę, mylą się i podają za przyczynę zakażenia ptasią grypą wywoływaną przez wirusa z rodziny *Orthomyxoviridae*. Dzieje się tak z powodu objawów *post mortem*, które zbliżone są do w/w choroby (krwotoki wewnętrzne, opuchlizna górnych części ciała, nekroza, opuchlizna, owrzodzenie tkanek limfoidalnych, zapalenie błony śluzowej tchawicy, zapalenie płuc, wybroczyny na workach powietrznych) (Alexander 2003).

Na przebieg choroby rzekomego pomoru drobiu bardzo duży wpływ mają zakażenia towarzyszące takimi patogenami jak: *Mycoplasma*, *E.coli*, oraz innymi wirusami. W tych wypadkach nawet szczepy lentogeniczne mogą powodować śmierć ptaków. Kury, które wcześniej miały kontakt z mało zjadliwym typem NDV nie manifestują zakażeń szczepami welogenicznymi (Nakamura et al. 1994).

Jedynymi sposobami walki z epidemiami rzekomego pomoru drobiu są szczepienia oraz zachowanie higieny hodowli ptaków. Polska, jako członek Unii Europejskiej,

zobowiązana jest do przestrzegania zasad dotyczących szczepionek zawartych w następujących dokumentach: Decyzja Komisji Europejskiej 93/152/EEC, Dyrektywa 2001/82/EC, Dyrektywa 2004/28/EC oraz Farmakopea Europejska. Według w/w aktów prawnych jako żywą szczepionkę, można wykorzystywać szczepy APMV-1 spełniające następujące kryteria: ICPI  $\leq 0,4$  (ang. Intracerebral Pathogenicity Index) jeśli do testów użyto nie mniej niż  $7 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> (ang. 50% Egg Infective Dose) na jednego ptaka lub ICPI  $\leq 0,5$  jeśli użyto nie mniej niż  $8 \log_{10}$  EID<sub>50</sub>. Aktualnie najczęściej stosuje się lentogeniczne wirusy izolowane z przypadków terenowych takie jak: Hitchner B1, LaSota/Clone 30, Ulster 2C, VG/GA, C2. Pomimo dopuszczenia w niektórych krajach Azji i Afryki szczepionek opartych na szczepach mezogenicznych, dla których ICPI mieści się w przedziale 0,7 do 1,5 (np. Mukteswar, Komarov, Roakin) w Unii Europejskiej są zabronione (DKE 93/152/EEC) (D2001/82/EC) (D2004/28/EC).

Ponieważ szczepienia niskopatogennym wariantem NDV uodparniają tylko przed wystąpieniem klinicznej formy choroby, a nie zapobiegają infekcjom szczepami wysoce zjadliwymi i ich siewstwu do środowiska, może dojść do niekontrolowanego namnażania się wirusów groźnej odmiany APMV-1. W dalszej perspektywie, gdy taki wirus znajdzie się w populacji podatnych zwierząt (np. nieszczepionych kur) doprowadzi w szybkim tempie do jej unicestwienia.

Dodatkowo udowodniono występowanie spontanicznych mutacji w materiale genetycznym nisko zjadliwych szczepów NDV, co wpływało na zmianę typu patogenności z lentogenicznego na welogeniczny (Gould et al. 2001).

Aktualny stan techniki pozwala na czułą detekcję wirusa rzekomego pomoru drobiu w próbach środowiskowych oraz na wstępne ustalenie zjadliwości poszczególnych izolatów. Metody te, opierające się na różnych wariacjach techniki real-time PCR, nie tylko nie są w stanie wykrywać i różnicować nowych nieopisanych szczepów NDV, ale również nie pozwalają na diagnozowanie zakażeń wieloszczepowych (Cattoli et al. 2010, Fuller et al. 2010, Li et al. 2009, Naveen et al. 2013, Tan et al. 2009, Yacoub et al. 2013, Zhang et al. 2010).

Konieczne wydaje się więc wprowadzenie nowej metody badań przesiewowych pozwalającej na szybką detekcję obcych (niewystępujących do tej pory w populacji) szczepów NDV, które potencjalnie mogą być wysoce patogenne.

Rozwiązanie opisanych powyżej problemów zostały osiągnięte w niniejszym wynalazku.

Celem wynalazku jest dostarczenie środków, które mogłyby być wykorzystane do wczesnej detekcji nowych w danej populacji, potencjalnie wysoce zjadliwych szczepów wirusa rzekomego pomoru drobiu nawet w sytuacji zakażeń wieloszczepowych.

Przedmiotem wynalazku jest sekwencja nukleotydowa starterów służąca do powielenia fragmentu genu białka fuzyjnego APMV-1 w obrębie ewolucyjnie silnie zachowanego fragmentu tego genu. Sekwencja starterów została tak opracowana, aby była komplementarna w możliwie największym stopniu do sekwencji przedstawionych na Fig. 1.

Korzystnie gdy sekwencja według wynalazku jest identyczna z sekwencją przedstawioną na Fig. 2.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie sekwencji nukleotydowej starterów do powielenia odcinka DNA (na matrycy RNA) o długości 123 par zasad, charakteryzujące się tym, że przeprowadza się reakcję RT-PCR w warunkach: (45°C-40'; 95°C-2'; 35 x [95°C-30"; 43°C-30"; 68°C-15"]; 68°C-2") i analizuje się produkty reakcji rozdzielając je w żelu agarozowym lub poliakryloamidowym, następnie barwiąc DNA z wykorzystaniem barwników interkalujących (np. bromek etydyny) lub metod opartych na redukcji jonów srebra.

Korzystnie gdy RNA matrycowym jest RNA wirusa rzekomego pomoru drobiu uzyskane w wyniku izolacji RNA z materiału środowiskowego takiego jak wymazy z układów oddechowego lub pokarmowego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie elektroforezy jednoniciowego DNA do analizy produktów RT-PCR, gdzie użyto matrycowego RNA wirusa rzekomego pomoru drobiu w celu stwierdzenia różnic w sekwencji nukleotydowej o tej samej długości.

Korzystnie gdy produkty reakcji są rozdzielane na żelu poliakryloamidowym przy skokowej zmianie temperatury rozdziału elektroforetycznego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie elektroforezy jednoniciowego DNA do analizy produktów RT-PCR, gdzie użyto matrycowego RNA wirusa rzekomego pomoru drobiu w celu stwierdzenia obecności dodatkowego szczepu w próbie środowiskowej.

Korzystnie gdy produkty reakcji są rozdzielane na żelu poliakryloamidowym przy skokowej zmianie temperatury rozdziału elektroforetycznego oraz w próbie środowiskowej znajdują się przyjemniej dwa różne szczepy NDV.

Załączone figury pozwalają na lepsze wyjaśnienie istoty wynalazku.

Figura 1 przedstawia fragment genu białka fuzyjnego różnych szczepów APMV-1 z zaznaczeniem sekwencji wybranej do powielania metodą RT-PCR.

Figura 2 przedstawia sekwencje starterów zdegenerowanych 5'>3' według IUPAC używanych do powielenia konserwowanego ewolucyjnie rejonu genu białka fuzyjnego NDV.

Figura 3 jest graficznym przedstawieniem genu białka fuzyjnego NDV, na którym zaznaczono fragment powielany przy użyciu starterów o sekwencji podanej na Fig. 2.

Figura 4 przedstawia żel agarozowy 2% po rozdziale produktów reakcji RT-PCR przy użyciu starterów zdegenerowanych przedstawionych na Fig. 2 na matrycy genomowego RNA różnych szczepów wirusa rzekomego pomoru drobiu. Na poszczególne ścieżki naniesiono:

1. pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23 (fragmenty: 34, 67, 110/111, 147, 190, 242, 331, 404, 489/501 par zasad)
2. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu LaSota NDV
3. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu Roakin NDV
4. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu Italy NDV
5. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu Ulster NDV
6. Kontrola negatywna (brak matrycy).

Fig. 5 przedstawia żel poliakryloamidowy wybarwiony metodą srebrową po rozdziale jednoniciowego DNA uzyskanego na matrycy genomowego RNA różnych szczepów wirusa rzekomego pomoru drobiu. Na poszczególne ścieżki naniesiono:

1. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu LaSota NDV
2. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu Roakin NDV
3. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA szczepu Italy NDV
4. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA izolowanego z wymazu z gardła kury zakażonej szczepami Roakin i Italy NDV
5. produkt reakcji RT-PCR na matrycy RNA izolowanego z wymazu z kloaki kury zakażonej szczepami Roakin i Italy NDV

Wynalazek jest szczegółowo opisany na przykładowych.

**Przykład 1.** Powielenie fragmentów genu kodującego białko fuzyjne (F) różnych szczepów wirusa rzekomego pomoru drobiu przy pomocy reakcji RT-PCR.

Powielono fragmenty DNA o wielkości 123 par zasad. Do reakcji RT-PCR użyto startery przedstawione na figurze 2 gdzie matrycą było RNA wyizolowane z czterech referencyjnych szczepów APMV-1: LaSota, Roakin, Italy oraz Ulster.

Reakcja PCR prowadzona była w następujących warunkach:

- 1x 45°C 40 min.
- 1x 95°C 2 min
- 35x 95°C 30 sek  
43°C 30 sek  
68°C 15 sek
- 1x 68°C 2 min.

Po przeprowadzeniu reakcji RT-PCR, produkty reakcji były analizowane metodą elektroforezy agarozowej, prążki po wybarwieniu bromkiem etydyny były oświetlane promieniowaniem nadfioletowym w zakresie około 360 nm i analizowane wizualnie na transiluminatorze. Prążki DNA powyżej wysokości prążka 111 par zasad wzorca pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 (fragmenty: 34, 67, 110/111, 147, 190, 242, 331, 404, 489/501 par zasad) odpowiadały tym, które powinny powstawać w reakcji RT-PCR przy użyciu zdegenerowanych starterów. W celu potwierdzenia powielenia fragmentu genu białka F w reakcji RT-PCR, prążki odpowiadające właściwej masie cząsteczkowej były izolowane z żelu agarozowego 2%. Oczyszczone fragmenty ligowano z wektorem pJET 1.2 (Fermentas), który służy do klonowania produktów po reakcji PCR. Mieszaniną reakcyjną transformowano komórki *Escherichia coli* TOP10, a następnie wysiewano je na płytki z podłożem selekcyjnym zawierającym w końcowym stężeniu ampicylinę 100µg/ml. Kolonie namnażano w hodowli płynnej z dodatkiem ampicyliny w stężeniu końcowym 100µg/ml i izolowano DNA plazmidowe za pomocą kolumniek firmy A&A BIOTECHNOLOGY. Każdy z plazmidów poddawano dokładnej analizie restrykcyjnej. Plazmidy zawierające wklonowane fragmenty i niezmieniony plazmid wyjściowy były w końcowym etapie sekwencjonowane przy użyciu uniwersalnych starterów pJET 1.2F i pJET 1.2R w celu potwierdzenia, że plazmid posiada sekwencję nukleotydową całkowicie zgodną z przewidywaniami teoretycznymi.

**Przykład 2.** Analiza MSSCP produktów reakcji RT-PCR

Powstałe w wyniku reakcji RT-PCR produkty poddano analizie MSSCP (ang. Multitemperature Single Strand Conformation Polymorphism). Metoda ta pozwala na wykrywa-

nie mutacji punktowych w jednoniciowych fragmentach DNA rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym.


DNA zawieszano w buforze do denaturacji firmy KUCHARCZYK T.E. i inkubowano przez 3 minut w 97°C. Następnie próby nanoszono na żel poliakrylamidowy 11% i prowadzono elektroforezę w gradiencie temperatur:

1. 5°C, 400 Vh (35W)
2. 13°C, 300 Vh (35W)
3. 17°C, 250 Vh (35W)

Żel barwiono srebrem za pomocą zestawu do barwienia DNA/RNA w żelach poliakrylamidowych firmy KUCHARCZYK T.E. i przeprowadzono analizę uzyskanych wyników.

**Uniwersytet Gdański**  
Gdańsk - Polska  
zastępowany przez  
Rzecznika Patentowego

mgr inż. Andrzej M. Jaeszke  
rzecznik patentowy nr wp. 161/67  
European Trade Mark Attorney 27442



### Wykaz literatury


1. Aldous E.W., Mynn J.K., Banks J., Alexander D.J.: A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 2003, 32(3), 239-257.
2. Alexander D.J.: Newcastle disease – The Gordon Memorial Lecture. *British Poultry Science*, 2001, 42, 5-22.
3. Cattoli G., Fusaro A., Monne I., Molia S., Le Menach A., Maregeya B., Nchare A., Bangana I., Maina A.G., Koffi J.N., Thiam H., Bezeid O.E., Salviato A., Nisi R., Terregino C., Capua I.: Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa - Implications for diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142, 168-176.
4. Compans R., Choppin P.: The length of the helical nucleocapsid of Newcastle disease virus. *Virology* 196,33,344–346
5. Cross G.: Paramyxovirus-1 infection (Newcastle disease) of pigeons. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 1995, 4, 92-95.
6. Fuller C.M., Brodd L., Irvine R.M., Alexander D.J., Aldous E.W.: Development of an L gene real-time reverse-transcriptase PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. *Archives of Virology*, 2010, 155, 817-823.
7. Francis D.W.: Newcastle and psittacines, 1970-1971. *Poult Dig* 32, 16-19, 1973
8. Gould A.R., Kattenbelt J.A., Selleck P., Hansson E., Della-Porta A., Westbury H.A.: Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular epidemiological analysis of virus isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research*, 2001, 77, 51-60
9. Hlinak A., Mühle R.U., Werner O., Globig A., Starick E., Schirrmeyer H., Hoffmann B., Engelhardt A., Hübner D., Conraths F.J., Wallschläger D., Kruckenberg H., Müller T.: A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most

important resting sites of Germany. *Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 2006, 53(3), 105-10.

10. Kaleta E.F., Baldauf C.: Newcastle disease in free-living and petbirds. In: Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston (1988) pp. 197-246
11. Kapczynski D.R., King D.J.: Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, 2005,
12. Levine P.P.: World dissemination of Newcastle disease, in Hanson RP (ed): *Newcastle Disease, An Evolving Pathogen*. Madison, WI, The University of Wisconsin Press, 1964, pp 65-69.
13. Lancaster J.E.: *Newcastle Disease; A Review 1926-1964*. Monograph No. 3. Canada Department of Agriculture, Ottawa, 1966
14. Li X., Qiu Y., Yu A., Chai T., Zhang X., Liu J., Wang D., Wang H., Wang Z., Song C.: Degenerate primers based RT-PCR for rapid detection and differentiation of airborne chicken Newcastle disease virus in chicken houses. *Journal of Virological Methods*, 2009, 158(1-2), 1-5.
15. Naveen K.A., Singh S.D., Kataria J.M., Barathidasan R., Dhama K.: Detection and differentiation of pigeon paramyxovirus serotype-1 (PPMV-1) isolates by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Tropical Animal Health and Production*, 2013 Jan 20 (*in press*).
16. Maldonado A., Arenas A., Tarradas M.C., Carranza J., Luque I., Miranda A., Perea A.: Prevalence of antibodies to avian paramyxoviruses 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain. *Avian Pathology*, 1994, 23(1), 145-52
17. Mayo M.A.: A summary of the changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002, 147, 1655-1656.
18. Pfitzer S., Verwoerd D.J., Gerdes G.H., Labuschagne A.E., Erasmus A., Manvell R.J., Grund C.: Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa. *Avian Diseases*, 200, 44(3), 655-60.
19. Rosenberger J.K., Krauss W.C., Slemons R.D.: Isolation of Newcastle disease and type-A influenza viruses from migratory waterfowl in the Atlantic flyway. *Avian Disease*, 1974,18(4), 610-3
20. Samal S. Personal presentation 2004 Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine University of Maryland College Park
21. Samuel J.L., Spradbrow P.B.: Persistence of the V4 strain of Newcastle disease virus in an open-range flock of chickens. *Veterinary Record*, 1989, 124(8), 193-6.

22. Shengqing Y., Kishida N., Ito H., Kida H., Otsuki K., Kawaoka Y., Ito T.: Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology*, 2002, 301, 206-211.
23. Portner A.: Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Research*, 2004, 106, 133-145.
24. Takakuwa H., Ito T., Takada A., Okazaki K., Kida H.: Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 1998, 45(4), 207-15.
- Tan S.W., Ideris A., Omar A.R., Yusoff K., Hair-Bejo M.: Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with nucleocapsid gene-specific primers. *Journal of Virological Methods*, 2009, 160, 149-156.
25. Ujvári D., Wehmann E., Kaleta E.F., Werner O., Savić V., Nagy E., Czifra G., Lomniczi B.: Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Research*, 2003, 96(1-2), 63-73.
26. Vidal S., Kolakofsky D.: Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication. *Journal of Virology*. 1989 May, 63(5), 1951-1958
27. Werner O., Römer-Oberdörfer A., Köllner B., Manvell R.J., Alexander D.J.: Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathology*, 1999, 28(1), 79-88
28. Wobeser G., Leighton F.A., Norman R., Myers D.J., Onderka D., Pybus M.J., Neufeld J.L., Fox G.A., Alexander D.J.: Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. *The Canadian Veterinary Journal*, 1993, 34(9), 353-9.
29. Yacoub A., Leijon M., McMenemy M.J., Ullman K., McKillen J., Allan G., Belák S.: Development of a novel real-time PCR-based strategy for simple and rapid molecular pathotyping of Newcastle disease virus. *Archives of Virology*, 2012 May, 157(5), 833-44.
30. Zhang L., Pan Z., Geng S., Chen X., Hu S., Liu H., Wu Y., Jiao X., Liu X.: Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89(2), 282-9.

**Uniwersytet Gdański**  
Gdańsk - Polska  
zastępowany przez  
Rzecznika Patentowego

  
mgr inż. Andrzej M. Jaeszke  
rzecznik patentowy nr wp. 161/67  
European Trade Mark Attorney 27442