

УДК 578.832.1.083.2

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.179191

РОЗРОБКА ЕКСПРЕС-МЕТОДУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ГЕНОТИПУВАННЯ ШТАМІВ H1N1 ТА H7N9 ВІРУСУ ПТАШИНОГО ГРИПУ А ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР – ПДРФ АНАЛІЗУ

С. В. Буряченко, Б. Т. Стегній

Епізоотичний моніторинг останніх років свідчить про те, що високопатогенний вірус грипу А птахів (H1N1) та (H7N9) активно циркулює на території Євразійських держав. За 2016 – 2019 рр. було зафіксовано 1,6 тис. випадків спалахів. З них у Європі 872 випадки. Питання моніторингу за інфікованою як перелітною так і свійською птицею в місцях перехресного контакту в Україні є актуальним для запобігання виникнення спалахів епізоотії.

Мета дослідження. Розробити експрес – метод ідентифікації та визначення вірусу пташиного грипу А H1N1 та H7N9 штамів на основі полімеразної ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) РНК вірусу.

Результати та обговорення. Проведений аналіз *in silico* ампліконів генів HA, NA та NP дозволив *in silico* розрахувати праймери до варіабельних локусів досліджуваних генів, розрахувати умови проведення реакції, визначити сайти рестрикції до добраних рестриктаз отримати теоретичні електрофореграми ПЛР – ПДРФ аналізу. Розроблено методику експрес – методу для виявлення та ідентифікації вірусу грипу А H1N1 та H7N9 за трьома генами (HA, NA та NP) РНК H1N1 та H7N9 у полімеразній ланцюговій реакції ПЛР суміщеній з ПДРФ аналізом. Метод експрес – діагностики здатний виявляти вірус пташиного грипу А H1N1 та H7N9 і диференціювати його від зразків інших збудників вірусних інфекцій птахів і тварин.

Висновки. Розроблений метод експрес – ідентифікації на основі ПЛР суміщеній з ПДРФ аналізом дає можливість значно спростити метод ідентифікації за рахунок специфічної ампліфікації ділянки РНК, що має поліморфний сайт рестрикції. Тестування стану цього локуса можливе шляхом попереднього проведення ПЛР та рестрикції ампліфікованого фрагменту. Встановлено, що метод експрес – діагностики ПЛР-ПДРФ здатний виявляти РНК вірус грипу А високопатогенних штамів H1N1 та H7N9 з високими показниками чутливості (100 % чутливість)

Ключові слова: високопатогенний вірус пташиного грипу А H1N1, H7N9, експрес-метод діагностики ПЛР-ПДРФ, консервативні мотиви, варіабельні локуси, поліморфізм

Copyright © 2019, S. Buriachenko, B. Stegnyy.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

1. Вступ

Вірус грипу типу А відноситься до родини *Orthomyxoviridae*, широко поширений у природі, вражає багато видів ссавців і птиці, в основному водного та навколководного комплексу, та має можливість викликати епідемії, пандемії та епізоотії [1]. Грип типу А вражає широке коло господарів: птахів, людей, свиней, коней, морських ссавців. Вірус грипу типу А поділяють на підтипи на основі антигенних властивостей його поверхневих глікопротеїнів - геммаглютиніну (H1-15) та нейрамінідази (N1-9). На сьогоднішній день серед свиней найбільш поширені три підтипи вірусу грипу А: H1N1, H3N2 та H1N2. Підтип H1N1 вважають класичним свинячим грипом, відомим з 1918 року. З 1979 р. у свиней виділяють антигенно відмінний варіант H1N1 пташиного походження. Вірус підтипу H1N1 є найбільш поширеним, антитіла до нього визначають у 25 % свиней по всьому світу. Грип свиней поширений в більшості країн світу з розвинутим свинарством. Хоча смертність від нього мінімальна, захворюваність може доходити до 100 %. Підтип вірусу H3N2 був вперше виявлений у

свиней в 1970 р., він вважається результатом міжвидового переходу вірусу грипу від людини к свиням [2]. Підтип H1N2 виділяють від свиней з 1994 р., цей підтип є результатом реасортації вірусів грипу свиней, людини і птиці. Вірус грипу А відрізняється високою ступенем варіабельності, особливо це стосується поверхневих глікопротеїнів віріона. У зв'язку з тим, що свині сприйнятливі до вірусів грипу А птахів та людини, вони вважаються проміжним господарем, в якому відбувається реасортація генів між свинячими, людськими та пташиними вірусами. З огляду на стійку наявність вірусів А(H7N9) в деяких популяціях свійської птиці представляє загрозу для здоров'я населення, так як ці віруси як правило викликають у людей тяжку хворобу, а також потенційно здатні до мутації, полегшуючи їх передачу від людини до людини [3]. Реасортація може призводити до виникнення нових антигенних варіантів вірусу грипу, потенційно здібних викликати епідемії серед людей. Ця обставина визначає значимість грипу А не тільки для ветеринарії, але і для охорони здоров'я людей. В цих умовах розробка методів швидкої та високоспецифі-

чної діагностики грипу А є край актуальною задачею. Запропонований метод виявлення вірусу грипу А заснований на полімеразній ланцюговій реакції суміщений з ПДРФ – аналізом з детекцією результатів. ПЛР-ПДРФ поєднує в собі переваги класичної ПЛР (високу чутливість, специфічність, швидкість отримання результатів) та одночасно має ряд переваг так як дозволяє визначити генетичні маркери. ПДРФ-маркери завдяки їх чіткої приналежності окремим генетичним локусам не поступаються по інформативності поширеним біохімічним маркерам і у багатьох випадках виявляються зручніше складних фенотипових ознак, що визначаються багатьма генними локусами. Методика заснована на ампліфікації висококонсервативних фрагментів генів гемаглютиніну, нейромінідази та нуклеопротеїду вірусу грипу А H1N1 та H7N9, та дозволяє виявляти вірус грипу А всіх підтипів. Класичними методами діагностики даного збудника є реакція гальмування гемаглютинації, реакція зв'язування комплементу, реакція нейтралізації, що дозволяє визначити наявність вірусних антигенів, а також метод імуноферментного аналізу, що дозволяє визначити наявність антитіл до вірусних антигенів у сироватках крові. Крім цього, існує ряд наборів для виявлення в біологічних пробах генетичного матеріалу вірусу грипу А методом полімеразної ланцюгової реакції (WHO 2005) [4].

2. Літературний огляд

Віруси грипу А підтипу H1N1 періодично виділяються від кур та інших видів птиці [5]. З 1994 року були виділені повні геноми кодуєчі послідовності перших трьох вірусів грипу H7N9 виділених від людей в Китаї. У Гонконзі відмічені спалахи захворювання, обумовлене прямою передачею вірусу грипу птиці H7N9 від качок людині [6]. Аналіз літератури показав, що випадки зараження людей вірусами грипу H7N9 раніше не реєструвалися. Аналогічним чином, до початку цього спалаху вірусу грипу H7N9 не виявилися серед тварин у Китаї. 4 квітня 2013 року, через всього декілька днів після оголошення про спалах серед людей, Міністерство сільського господарства Китаю повідомило про виявлення низькопатогенного грипу птахів H7N9 у різних видів птахів в місті Шанхай (OIE2013b). Нуклеотидні послідовності 8 генів цих вірусів були практично ідентичні один одному і генам вірусів, виділених у випадках зараження людей. Для більшості генів відсоток ідентичності складав 99 % або вище. Одночасне виявлення практично ідентичних вірусів грипу H7N9 у свійських птахів і людей, що мешкають осеред, в одному і тому ж місті свідчить про те, що випадки зараження людей можуть бути пов'язані з контактом з птахами. Спостерігається поширення грипу птиці, викликаного вірусом H1N1, в країнах Азії та Європи [7]. Протягом 2004 року ВОЗ постійно інформувала про випадки зараження людей грипом птиці, причому хвороба протікала з летальністю більше 70 %. Доказано, що підтип H1N1 вірусу грипу А здатний мутувати з високою швидкістю та утворювати високопатогенні штами вірусу грипу, які в майбутньому можуть представляти серйозну епідемічну небезпеку [8]. Різні генетичні варіанти вірусів грипу (штами)

розрізняються так званими сайтами патогенності – нуклеотидними послідовностями у складі РНК, кодуєчих синтез факторів, що обумовлюють тяжкість захворювання, контагіозність, сприйнятливість до лікарських протівірусних засобів. Висока мінливість вірусу призводить до появи з періодичністю у 2–3 роки нових патогенних для людини генетичних варіантів та мутацій, змінюючих стійкість допротигрипозних препаратів [9]. Примітною особливістю вірусу пандемічного грипу H1N1 2009 року є його ефективна проникність у людей у порівнянні з такою у штамів-попередників лінії потрійного реасортантного вірусу свиного грипу, які викликають тільки спорадичні інфекції у людей. Вірусні компоненти, необхідні для цього фенотипу, не були повністю з'ясовані [10]. Однак вивчення тільки даних послідовності грипу не дозволяє оцінити пандемічний потенціал вірусу. Оцінка ризику пандемії, в якій використовуються дані послідовностей, може мати місце тільки після того, як критичні генетичні ознаки визначені в ході лабораторних досліджень наслідків для відповідних біологічних властивостей (або фенотипів). Віруси, що володіють цікавими або викликаючими занепокоєння фенотипами, часто стають кандидатами для досліджень зворотної генетики, які необхідні для з'ясування точних молекулярних корелятивів даного фенотипу [11].

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – використовуючи метод аналізу ПЛР – ПДРФ генів гемаглютиніну, нейромінідази та нуклеопротеїду з використанням двох типів рестриктаз Aval, Apal, BamHI, EcoRI, ClaI, NcoI, PstI та HindIII ідентифікувати штами вірусів грипу А H1N1 та H7N9 і визначити специфічність методу експрес – діагностики.

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Розрахувати праймери та відповідні рестриктази до найбільш консервативних ділянок вірусного геному генів HA, NA та NP штамів H1N1 та H7N9;
2. Провести аналіз ПДРФ *in silico* ампліконів генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 з використанням даних GenBank для рестриктаз Aval, Apal, BamHI, EcoRI, ClaI, NcoI, PstI та HindIII та побудувати теоретичні електрофореграми;
3. Окреслити умови проведення ПЛР та ПДРФ аналізу;
4. Визначити методику виділення вірусної РНК
5. Провести ПЛР *in silico*, з ампліконами генів HA, NA та NP досліджуваних штамів, піддати амплікони рестрикції з використанням рестриктаз Aval, Apal, BamHI, EcoRI, ClaI, NcoI, PstI та HindIII;
6. Провести візуалізацію та ідентифікацію продуктів ПЛР-ПДРФ-аналізу;
7. Визначити методику експрес – діагностики штамів H1N1 та H7N9 вірусу пташиного грипу А за генами HA, NA та NP.

4. Матеріали та методи

На основі аналізу поліморфізму генів гемаглютиніну, нейромінідази та нуклеопротеїду їх варіабельних локусів отримали пари олігонуклеотидів

специфічних для вірусних підтипів H1N1 та H7N9. Для підбору праймерів використовували більше 8000 послідовностей генів HA, NA та NP вірусу грипу А підтипів H1N1 та H7N9, виділені до 2017 року. Послідовності проаналізували з використанням програм Alignment Service та Lasergene (версія 6.0). Рівень гомології підібраних праймерів не менше ніж 95 %.

4. 1. Розрахунок праймерів та визначення умов проведення ПЛР

Враховуючи велику варіабельність геному вірусу грипу типу А, при його визначенні необхідно використовувати праймери, що відповідають найбільш консервативним ділянкам вірусного геному. Основою для пошуку місць відпалу праймерів стало зіставлення нуклеотидних послідовностей генів гема-

глютиніну, нейромінідази та нуклеопротейду всіх вірусів грипу, представлених в міжнародній базі даних. При виборі місць посадки праймерів враховували наступні вимоги: специфічність праймерів для всіх послідовностей вірусів підтипів H1N1 та H7N9, відсутність місць відпалу праймерів на послідовності вірусів інших підтипів. Цю роботу виконували за допомогою програм Lasergene (версія 6.0), BioEdit (версія 7.00) та Amplify (версія 1.06 Univers. ofWisconsin, Genetics, Madison). В якості додаткових критеріїв, визначаючих придатність праймерів, враховували наступні: відсутність дуплексів праймерів і відпалу їх один на одного, відсутність місць помилкового відпалу на матриці геномів різних штамів вірусу грипу А і споріднених вірусів. Цим критерієм задовольняють всі відібрані праймери (табл. 1).

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності генів HA, NA та NP вірусу грипу А штамів H1N1 та H7N9, отриманих з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації

Ген	Штам	Нуклеотидна послідовність (accession number)
HA	H1N1	AF222030, AF222031, AF222034, CY022125, CY022317, CY022325, CY022978, CY025205, CY027507, CY028171, CY028788, CY084473, CY084697, CY084769, CY130118, CY147312, EU735786, FJ357104, L09063, U53162
	H7N9	CY235363, KP417486, KP417862, KP417921, KP417982, KP418006, KP418524, KP418537, KY286427, KY751037, KY751049, KY751050, KY751055, MF630189
		MF630317, MF630349, MF630429, MF630485, MF630517, MG930768
NA	H1N1	AB539741, CY065997, CY123246, CY124014, GU560010, JN006471, JN006483, JN006486, JN006487, JN006490, JN036561, JN036564, JN207838, JN631046, JX625984, KC781780, KC782242, KP019721, KP019726, MG982621
	H7N9	CY181515, CY181531, CY181579, CY187436, CY187452, CY187620, CY192837, CY192845, CY192853, CY192861, CY192869, CY192877, CY192901, CY192909, CY192917, CY192925, KC853231, KF500929, KF918661, KJ633810
NP	H1N1	AB539740, CY049397, CY049405, CY049452, CY049484, CY049508, CY054663, CY062093, CY100509, CY100531, CY107655, GU198202, GU367320, HQ541691, HQ541691, KY924938, KY925021, KY926173, KY926377, LN867757
	H7N9	CY192070, CY192078, CY192086, CY192094, CY192102, CY192110, CY192118, CY192134, CY192142, CY192150, CY193206, CY193214, CY193222, CY193230, CY193238, CY193246, CY193254, KF609528, MF630414, MF988739

4. 2. Виділення РНК

Із зразків досліджуваного біологічного матеріалу (носові змиви, екссудат трахеї, 10 % суспензія легеневої тканини та бронхів, культури клітин що містять віруси) відбирали 0,1 мл у поліпропіленову пробірку об'ємом 1,5 мл, змішували з 0,2 мл 6М розчином гуанідинтіоціаната (ГТЦ) та інкубували при кімнатній температурі 3–5 хв. Додавали 0,3 мл етилового спирту, перемішували та наносили на мініколонки із скловолокнистими фільтрами GF/F. За допомогою вакуумного насоса та пристрою для фільтрації Vacuim Manifold суміш фільтрували. Далі фільтри промивали 3 мл 80 % етанолу та центрифугували протягом 1 хв. при 13000 g для видалення залишків етанолу. Переносили мініколонку у нову пробірку, добавляли 50 мкл води і через 3–5 хв центрифугували 30 сек при 10000–13000 g. Отриманий розчин РНК відразу використовують у реакції зворотної транскрипції або зберігають при –70 °С. Крім описаної вище методики також можуть бути використані вітчизняні або імпортовані комерційні набори для виділення РНК фірм Біоком, Qiagen та інших виробників.

4. 3. Визначення умов проведення ПЛР

Відсутність гомології з іншими вірусами родини *Orthomyxoviridae* та з іншими підтипами вірусу грипу А було основним критерієм відбору олігонуклеотидів. Таким чином, для кожного гена (HA, NA та NP) вірусу грипу А підтипу H1N1 та H7N9 була підібрана пара праймерів, яка висококонсервативна і специфічна до свого підтипу і не має гомології з іншими підтипами вірусу грипу А та з іншими спорідненими вірусами. Розраховані олігонуклеотиди були синтезовані на автоматичному синтезаторі 349 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems (США)) по стандартній методиці. Запропонований спосіб включає в себе дві основні реакції. Перша – це ПЛР з праймерами до гемаглютиніну – HA5 – ACACCAGCCTCCCATTTCAG, та CCCCCTCAATAAAGCCAGCA. HA10 – що включає праймери GCCGCAAATGCAGACACATT та GCTGCCGTCACACCTCTATT. Друга ПЛР з праймерами, специфічними до ділянки гена нейрамінідази. Матрицею для цієї реакції слугує одноланцюгова РНК вірусу грипу, а затравкою - праймери, що складаються з 20 ланок: NA1 CAGGAGCCCATATCGAACCC

та СТТТGGGTCGCCCTCTGATT. Для гену NA8 праймери TGCAGGGATAACTGGCATGG та GCTCCCCTAGTCCAGATTG. Третя ПЛР з праймерами, специфічними до ділянки гена нуклеопротеїду (NP5) вірусу грипу А. GTGGTCAGCCTGATGAGACC та GGGTTCGTTGCSTTTTCGTC, комплементарні не менше ніж на 95 % гену гемаглютиніну, нейромінідази та нуклеопротеїду, визначення в зразках, що аналізуються, продуктів ПЛР (фрагментів РНК) розміром 958 п. н. для праймерів, специфічних H1N1, і 966 нуклеотидних пар для праймерів (HA5, специфічних H7N9. Для HA10: 416 пар для H1N1 і 411 для H7N9. Для NA1 (H1N1) 845 п. н. і 848 для H7N9, для NA8 (H1N1) 450 пар та 447 для H7N9. Повний аналіз включає в себе 5 етапів: екстракція РНК із зразків біологічного матеріалу, отримання зразка кДНК в реакції зворотної транскрипції РНК, ПЛР – ампліфікацію ділянок генів гемаглютиніну, нейромінідази

та нуклеопротеїду, проведення ПДРФ-аналізу та візуалізація та ідентифікація продуктів електрофорезу. Екстракцію нуклеїнових кислот вірусів грипу з клінічного матеріалу проводили в присутності внутрішнього контрольного зразка (ВКО Sti-rec). Для запобігання перехресної контамінації до початку роботи маркували чисті пробірки об'ємом 1.5 мл та вносили в них по 600 мкл розчину, що має гуанідінітіоанат.

Зразки досліджуваного матеріалу (в об'ємі 200 мкл) використовували для аналізу. Використовували метод виділення з неорганічного сорбента "SiO₂". РНК елюїровали в 30 мкл деіонізованої води, вільної від РНК-аз при 56 °С в закритих пробірках. В окремій пробірці готували загальну реакційну суміш на N зразків, в число яких входять позитивний та негативний контролю. Реактиви вносять у послідовності, приведеної у табл. 2. Ферменти додають в останню чергу.

Таблиця 2

Умови проведення ПЛР

Реакція ПЛР-1 для штаму H1N1 вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-1	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-гемаглютиніну	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)
Реакція ПЛР-1 для нейрамінідази вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-1	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-нейрамінідази	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)
Реакція ПЛР-1 для нуклеопротеїду вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-1	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-нуклеопротеїду	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)
Реакція ПЛР-2 для штаму H7N9 вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-2	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-гемаглютиніну	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)
Реакція ПЛР-2 для нейрамінідази вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-2	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-нейрамінідази	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)
Реакція ПЛР-2 для нуклеопротеїду вірусу грипу А.		
Реактив	Кіл-ть на 1 пробу	Кіл-ть на N проб
Буферний розчин для ПЛР-2	14.625	14.625×(N+1)
Праймери для ПЛР-нуклеопротеїду	4.5	4.5×(N+1)
Фермент Таq-полімераза	0.25	0.25×(N+1)
Фермент MMLV ревертаза + інгібітор РНКаз	0.625	0.625×(N+1)

Суміш перемішували і додавали по 20 мкл у пробірки, в кожену пробірку добавляли по 2–3 краплі масла (приблизно, 40 мкл). Потім у них вносили окремим накінецьником з фільтром під масло по 5 мкл РНК відповідних аналізуючих або контрольних зразків (K⁺ та K⁻). Проби вносили в ампліфікатор з наступним температурним режимом:

Добрані праймери мають температуру плавлення приблизно 60 °С. Для використання розробле-

них пар праймерів були підібрані наступні температурно – часові умови:

- 1) 1 цикл –180 с при 94 °С;
- 2) 35 циклів по 60 с при 94 °С, 60 с при 60 °С та 120 с при 72 °С;
- 3) 420 с при 72 °С.

Результати ПЛР з добрими праймерами до наявних нуклеотидних послідовностей штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А наведенні у табл. 3–5.

Таблиця 3

Добрані праймери до гену *HA* вірусу грипу А

Назва пари праймерів	Послідовність (5'→3') праймеру		Довжина прямого/зворотнього праймеру (п.н.),	GC %прямого/зворотнього праймеру
	прямого	зворотнього		
HA5	AGACCCAAGGTGAGAGGTCA	AGAAACTGATTGCCCCAGG	20/20	55/55
HA10	GCCGCAAATGCAGACACATT	GCTGCCGTCACACCTTATT	20/20	50/55

Таблиця 4

Добрані праймери до гену *NA* вірусу грипу А

Назва пари праймерів	Послідовність (5'→3') праймеру		Довжина прямого/зворотнього праймеру (п.н.),	GC %прямого/зворотнього праймеру
	прямого	зворотнього		
NA1	CAGGAGCCCATATCGAACCC	CTTTGGGTTCGCCCTTGATT	20/20	60/55
NA8	TGCAGGGATAACTGGCATGG	GCTCCCGTAGTCCAGATTG	20/20	55/60

Таблиця 5

Добрані праймери до гену *NP* вірусу грипу А

Назва пари праймерів	Послідовність (5'→3') праймеру		Довжина прямого/зворотнього праймеру (п.н.),	GC % прямого/зворотнього праймеру
	прямого	зворотнього		
NP5	GTGGTCAGCCTGATGAGACC	GGGTTCGTTGCCTTTTCGTC	20/20	60/55

Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в 2 % агарозному гелі, що містить бромистий етидій. Досліджувалася аліквота (7 мкл водної фази ампліфікаційної суміші). Електрофорез проводили при напруженості електричного поля 8 вольт/см в агарозному гелі, протягом 60 хв. За цей час продукт реакції встигає пройти не менше половини геля. Рекомендований розмір геля 5–10 см. Направлення руху зразків у гелі від "–" до "+". Результати електрофорезу переглядали в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 254 нм на приладі "Транслюмінатор". Результати реакції виявляються у вигляді червоних смуг що світяться. Пари праймерів HA5, HA10, NA1, NA8 та NP5 утворюють продукт ампліфікації специфічного розміру.

4. 4. ПДРФ аналіз та електрофореграма до рестриктаз

Проведення ПДРФ аналізу здійснювали з використанням 2-х типів рестриктаз Aval, AраI, BamHI, EcoRI, ClaI, NcoI, PstI та HindIII. ПДРФ аналіз включає в себе виділення геномної вірусної РНК, її рестрикцію специфічною ендонуклеазою, електрофоретичне розділення утворених фрагментів РНК та ідентифікацію фрагментів РНК, що мають поліморфний сайт рестрикції, шляхом блот-гібридизації по Саузєрну. Реакційну суміш аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі.

Були визначені сайти рестрикції генів *HA*, *NA* та *NP* штамів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А та добрані відповідні рестриктази (табл. 6).

Таблиця 6
Сайти рестрикції генів *HA*, *NA* та *NP* штамів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А

Ген	Штам	Сайт рестрикції	Кількість сайтів рестрикції даного типу
<i>HA</i>	H1N1	EcoR1	1
	H7N9	PstI	2
		BamHI	1
		HindIII	1
		EcoR1	1
		ApaLI	1
<i>NA</i>	H1N1	BamHI	1
	H7N9	PstI	2
		AvaI	1
		ClaI	1
		EcoR1	1
<i>NP</i>	H1N1 ¹	ApaLI	1
		BamHI	1
		HindIII	1
		NcoI	1
	H7N9	BamHI	1
		AvaI	1
		PstI	3

Примітка: сайти рестрикції та добрані рестриктази нуклеотидної послідовності GU367320 штаму H1N1 є ідентичними сайтам рестрикції та рестриктазам штаму H7N9

Візуалізація та ідентифікація продуктів ПДРФ-аналізу проводилася шляхом їх електрофоретичного розподілу.

5. Результати дослідження

Після проведення аналізу *in silico* ампліконів генів *HA*, *NA* та *NP* за допомогою програм Lasergene (версія 6.0), BioEdit (версія 7.00) та Amplify (версія 1.06 Univers. of Wisconsin, Genetics, Madison), були отримані теоретичні електрофореграми ПЛР та ПДРФ – аналізу, розраховані умови проведення ПЛР, визначені сайти рестрикції та добрані рестриктази нуклеотидної послідовності штаму H1N1 та H7N9. Розроблений спосіб виявлення вірусу на основі ампліфікації ділянки кДНК вірусу грипу А за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПДРФ аналізу ділянки вірусного гену гемаглютиніну, нейрамінідази та нуклеопротеїду для збільшення кількості копій РНК вірусу грипу А підтипів H1N1 та H7N9. При цьому рівень гомології підібраних праймерів складає не менше 95 % для трьох генів. Вірус визначається, якщо після розділення частини реакційної суміші в агарозному гелі в аналізуючому зразку виявляються фрагменти РНК розміром. Для NP5 (H1N1) 166 та 163,166 для H7N9 при використанні праймерів, специфічних до генів гемаглютиніну,

нейромінідази та нуклеопротеїду, свідчить про наявність в початковому матеріалі РНК вірусів (рис. 1).

Позитивними вважають проби, смуги в яких розташовуються в гелі на рівні смуги позитивного контролю.

Досліджувані проби вважають негативними, якщо в них не виявлено ніяких смуг або смуги не відповідають за розміром фрагменту в контрольній пробі (т.і. розташовуються на іншій відстані від старту).

Отриманні дані ПЛР – аналізу гену *NA* штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А з добрими праймерами та продуктами ампліфікації кожного гену досліджуваних штамів (табл. 7).

Отриманні дані ПЛР – аналізу гену *NA* штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А з добрими праймерами та продуктами ампліфікації кожного гену досліджуваних штамів (табл. 8).

Отриманні дані ПЛР – аналізу гену *NP* штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А з добрими праймерами та продуктами ампліфікації кожного гену досліджуваних штамів (табл. 9).

Таблиця 7
Результати ПЛР-аналізу гену *HA* штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А

Пара праймерів	Продукт ампліфікації, п.н.	
	H1N1	H7N9
HA1	159	159
HA2	366	366
HA3	149	149
HA4	166	166
HA5	958	966
HA6	76	76
HA7	158	158
HA8	72	72
HA9	312	312
HA10	416	411

Таблиця 8
Результати ПЛР-аналізу гену *NA* штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А

Пара праймерів	Продукт ампліфікації, п.н.	
	H1N1	H7N9
NA1	845	848
NA2	544	547
NA3	165	165
NA4	252	252
NA5	166	166
NA6	626	629
NA7	114	114
NA8	450	447
NA9	164	164
NA10	101	101

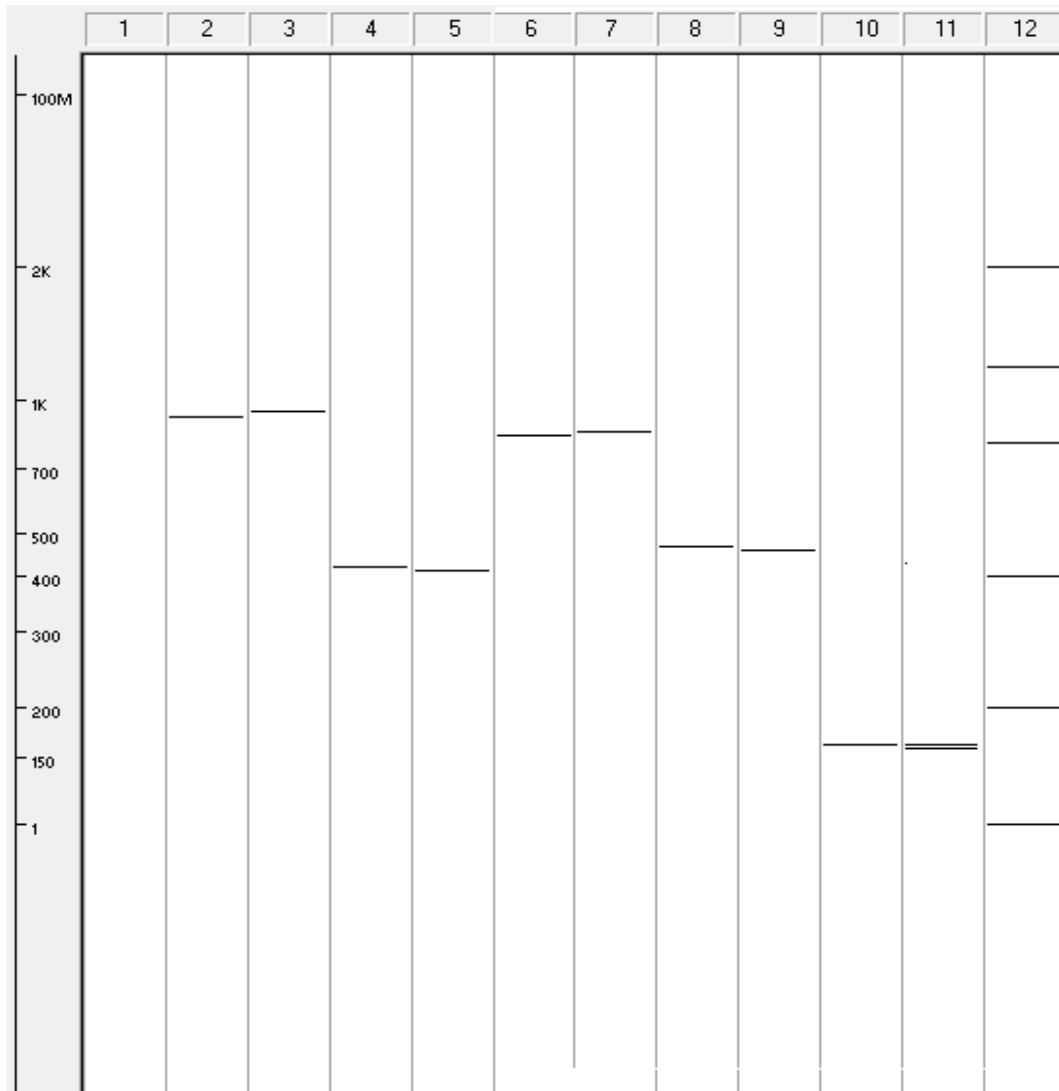


Рис. 1. Схема ідентифікації продуктів ПЛР-аналізу штамів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А методом Електрофорезу: 1 – контроль якості реакції (ПЛР-суміш без вірусної РНК); 2– продукт ампліфікації з праймером HA5 штаму H1N1; 3 – продукт ампліфікації з праймером HA5 штаму H7N9; 4 – продукт ампліфікації з праймером HA10 штаму H1N1; 5 – продукт ампліфікації з праймером HA10 штаму H7N9; 6 – продукт ампліфікації з праймером NA1 штаму H1N1; 7 – продукт ампліфікації з праймером NA1 штаму H7N9; 8 – продукт ампліфікації з праймером NA8 штаму H1N1; 9 – продукт ампліфікації з праймером NA8 штаму H7N9; 10 – продукт ампліфікації з праймером NP5 штаму H1N1; 11 – продукт ампліфікації з праймером NP5 штаму H7N9; 12 – ДНК-маркер молекулярної маси 100 п.н. Ladder

Таблиця 9

Результати ПЛР-аналізу гену NP штамів H1N1 і H7N9 вірусу грипу А

Пара праймерів	Продукт ампліфікації, п.н.	
	H1N1	H7N9
NP1	845	845
NP2	544	544
NP3	165	165
NP4	252	252
NP5 ¹	166	163,166
NP6	626	626
NP7	114	114
NP8	450	450
NP9	164	164
NP10	101	101

Примітка: розмір продукту ампліфікації нуклеотидної послідовності GU367320 штаму H1N1 є ідентичним розміру продукту ампліфікації нуклеотидних послідовностей штаму H7N9

У негативному контролі не повинно виявлятися ніяких смуг. Присутність у негативному контролі забарвлених фрагментів на рівні смуг позитивного контролю свідчить про перехресну контамінацію у процесі аналізу. Результати анулюються. Аналіз необхідно провести заново. При відсутності рестрикції при ПДРФ аналізі у поліморфному сайті на електрофореграмах буде виявлятися один великий фрагмент, що відповідає по довжині послідовності РНК між двома сусідніми сайтами рестрикції для тої ж ендонуклеази. При наявності рестрикції у поліморфному локусі на електрофореграмі буде присутній менший за розмірами фрагмент, рівний відс-

тані між поліморфним сайтом рестрикції і одним з ближніх константних сайтів рестрикції (рис. 2).

Виключенням є ідентифікація штаму H1N1, одні зразки якого утворюють при ПДРФ-аналізі з використанням добраних рестриктаз до гену *NP* унікальні продукти розмірами 49 – 50, 348 – 350, 592 – 599 п.н., інші – фрагмент ампліфікації розмірами 21, 39, 201 – 203, 471 – 480 п.н., ідентичні продуктам ПДРФ-аналізу з використанням добраних рестриктаз з штамом H7N9 (табл. 10).

Візуалізація та ідентифікація продуктів ПДРФ-аналізу проводиться шляхом їх електрофоретичного розподілу.

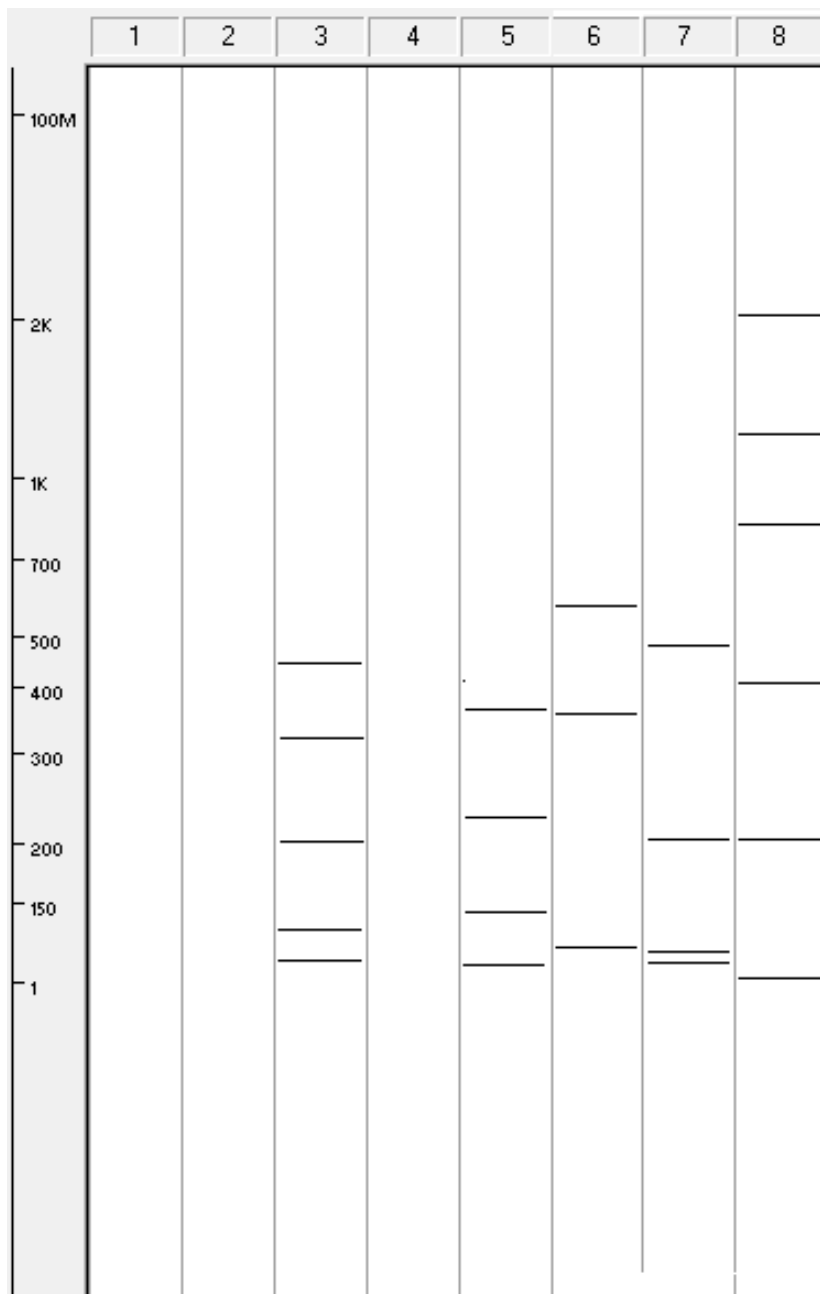


Рис. 2. Схема ідентифікації продуктів ПДРФ-аналізу штамів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А методом електрофору *in silico*: 1 – контроль якості реакції (ПДРФ-суміш без вірусної РНК); 2 – продукт ПДРФ-аналізу гену *HA* штаму H1N1; 3 – продукт ПДРФ-аналізу гену *HA* штаму H7N9; 4 – продукт ПДРФ-аналізу гену *NA* штаму H1N1; 5 – продукт ПДРФ-аналізу гену *NA* штаму H7N9; 6 – продукт ПДРФ-аналізу гену *NP* штаму H1N1; 7 – продукт ПДРФ-аналізу гену *NP* штаму H7N9; 8 – ДНК-маркер молекулярної маси 100 п.н. Ladder

Таблиця 10
Результати ПДРФ-аналізу генів *HA*, *NA* та *NP* штамів
H1N1 та H7N9 вірусу грипу А

Ген	Штам	Розмір продуктів ПДРФ-аналізу (п.н.)
<i>HA</i>	H1N1	–
	H7N9	25–27, 97–101, 204–210, 327–330, 443–449
<i>NA</i>	H1N1	–
	H7N9	18, 141–143, 229–232, 354–359
<i>NP</i>	H1N1 ¹	49–50, 348–350, 592–599
	H7N9	21, 39, 201–203, 471–480

Примітка: продукти ПДРФ-аналізу послідовності GU367320 штаму H1N1 є ідентичними продуктами ПДРФ-аналізу штаму H7N9

Запропонований метод ПЛР суміщений з ПДРФ-аналізом дає можливість значно спростити метод ідентифікації за рахунок специфічної ампліфікації ділянки РНК, що має поліморфний сайт рестрикції. Тестування стану цього локуса можливе шляхом попереднього проведення ПЛР та рестрикції ампліфікованого фрагменту. При відсутності сайту впізнання у досліджуваній області вірусної РНК розміри ампліфікованого фрагменту не зміняться після його обробки відповідною ендонуклеазою, тоді як при повній відповідності поліморфної області сайту рестрикції утворюються два фрагменти меншої дов-

жини. У гетерозигот будуть присутні 3 фрагменти, один із яких по довжині буде відповідати розміру ампліфіката до рестрикції, плюс 2 не великих фрагмента с тією ж сумарною довжиною. Таким чином, як і у випадку використання для аналізу блот-гібридизації по Саузерну, трьом можливим варіантам генотипу будуть відповідати три різні варіанти електрофореграм. Таким чином розроблено метод експрес – діагностики, що здатен виявляти збудників вірусу пташиного грипу А штамів H1N1 та H7N9 включає в себе два етапи і починається з надходження досліджуваного біологічного матеріалу у лабораторію, виділення вірусної РНК, проведення ПЛР з добрими праймерами, проведення ПДРФ аналізу з добрими рестриктазами та обрахуванням результатів (рис. 3). Тест – система здібна виявляти збудника грипу А штамів H1 та H7 навіть у випадку багаточисленних мутацій і реасортацій генетичного матеріалу. Дозволяє не тільки визначати два даних підтипи, але і диференціювати їх від інших підтипів вірусу грипу А. Запропонований метод діагностики вірусу пташиного грипу А методом ПЛР – ПДРФ є високочутливим та високоспецифічним до вірусу грипу А підтипів H1N1 та H7N9 і дозволяє достовірно визначити наявність РНК вірусу даного підтипу в біологічних пробах без попереднього накопичення тестуючого вірусу, що особливо важливо при роботі з високпатогенними штамми.

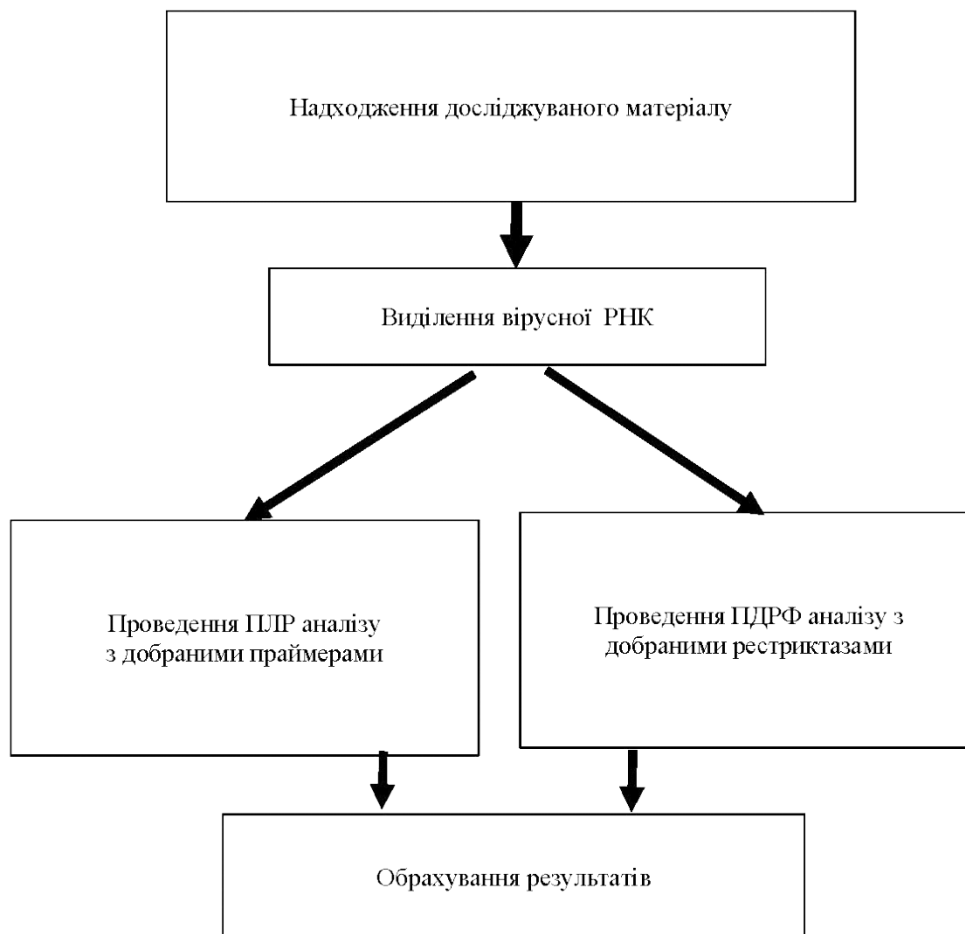


Рис. 3. Методика експрес-діагностики штамів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А за генами *HA*, *NA* та *NP*

6. Обговорення результатів дослідження

Найбільш поширеними методами ідентифікації підтипів H1N1 та H7N9 вірусу грипу А є реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) з антисироватками до еталонних штамів вірусу грипу для визначення підтипу гемаглютиніну і реакція інгібування нейрамінідазної активності (РІНА) – для визначення підтипу нейромінідази. Недоліком є підвищена біологічна небезпека, трудомісткість та тривалість часу, необхідні для попереднього культивування (від 3 до 7 днів) [13]. Розроблений нами спосіб ідентифікації проводиться без попереднього культивування вірусу на курячих ембріонах. Методи, основані на використанні полі- або моноклональних антитіл, імуноферментний та імунофлуоресцентний аналіз з використанням антитіл потребують наявності набору специфічних антитіл для кожного підтипу ВГА, які кошторисні і важкі в отриманні, і застосовуються для обмеженої кількості підтипів [14]. В останній час все більш широке поширення отримують молекулярно-генетичні методи аналізу, основаних на аналізі послідовностей вірусного геному, включаючи послідовності генів HA та NA сайти патогенності. Проводиться ампліфікація відповідних ділянок геному з послідувачим аналізом результатів різними методами [15]. Повне або часткове секвенування вірусних генів. Описана ампліфікація будь-яких можливих підтипів ВГА за допомогою універсальної праймерної системи з послідувачим секвенуванням [16]. Донедоліків методів, основаних на секвенуванні, відноситься їх трудомісткість, кошторисність, необхідність кошторисного обладнання (наприклад, автоматичний секвенатор), а також значні витрати часу та реагентів на додаткову очистку продуктів ампліфікації перед проведенням секвенування [17]. Методи ПЛР с детекцією в режимі реального часу використовуються як для типування вірусу грипу А, так і для визначення мутацій, що призводять до лікарської стійкості штаму H1N1 [18]. Для ПЛР в реальному часі описані також методики з кількісним визначенням вірусу субтипів H1N1 та H7N9 [19]. До недоліків вищевказаних ПЛР-методів (5)–(9) відноситься їх трудоємність, а також обмеженість в числі визначених підтипів вірусу. Метод визначення поліморфізму ПЛР-гетеродуплексний аналіз надзвичайно ускладнюється при збільшенні кількості диференційованих підтипів. Метод ПЛР в реальному часі потребує постановки окремих реакцій для визначення кожної мутації при цьому вельми дорогий для рутинного аналізу [20]. Многопараметричний аналіз генетичного матеріалу з використанням ДНК-мікроматриць (мікрочипів), представляючих собою масив іммобілізованих на твердій фазі олігонуклеотидів, здатних специфічно зв'язуватися с детектуєчими послідовностями. Для ідентифікації типування вірусу грипу підтипів H1N1 та H7N9 описані мікрочипи двох типів: ДНК-мікроматриць високої щільності і спеціалізовані олігонуклеотидні мікрочипу [21]. До недоліків мікрочипів низької щільності відноситься їх неуніверсальність: вони придатні тільки для ідентифікації і типування вірусу грипу, або субтипуювання вірусу грипу А, або для аналізу стійкості до обмеженої кількості антивірусних препаратів. Як правило, мікрочипи

дозволяють ідентифікувати лише невелику кількість типів і субтипів вірусу у відмінності від нашого способу. Ізотермічна ампліфікація (LAMP) хоч і дозволяє проводити молекулярну діагностику суттєво дешевше та швидше, у порівнянні з ПЛР (зворотню транскрипцію та ампліфікацію) в одній пробірці, без переносу рідини і має багато переваг [22, 23]. Метод ПЛР – ПДРФ запропонований нами для ідентифікації штамів H1N1 та H7N9 вірусу дозволяє визначити точно поліморфізм у генах на основі порівняння довжин варіабельних ділянок РНК, потенційно маючих пошкоджений ген, дозволяє виявляти вірусний матеріал в одній реакційній суміші, скорочує час діагностики, відсоток фінансових витрат і технологічних помилок. Безсумнівною та головною перевагою методу є можливість швидкого створення на його основі простих та надійних систем тестування. Недоліком є тривалість 6–8 годин до отримання результату, та відсутність можливості автоматизації.

Обмеження дослідження. Метод ПЛР – ПДРФ дозволяє детектувати тільки заміни, розташовані у сайтах, що розпізнаються ендонуклеазою рестрикції.

Перспективи подальших досліджень. В рамках цієї статті був представлений розроблений нами метод експрес – діагностики та ідентифікації штамів пташиного грипу А H1N1 та H7N9 за аналізом варіабельності генів HA, NA та NP, були визначені матеріали та елементи розпізнавання, методи вимірювання, чутливості, особливості. Метод розроблений нами *in silico* потребує проведення експериментальної його апробації та дослідження специфічності щодо дослідження РНК вірусів (хвороби Ньюкасла птахів, віспи птахів, синдрому зниження яйценосності та грипу коней).

6. Висновки

1. Проведений аналіз *in silico* варіабельних локусів генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 дозволив розрахувати праймери, визначити умови проведення реакцій та добрати рестриктази до сайтів рестрикції.

2. Розроблений метод експрес – ідентифікації на основі ПЛР суміщений з ПДРФ аналізом дає можливість значно спростити метод ідентифікації за рахунок специфічної ампліфікації ділянки РНК, що має поліморфний сайт рестрикції. Тестування стану цього локуса можливе шляхом попереднього проведення ПЛР та рестрикції ампліфікованого фрагменту.

3 За проведенням *in silico* аналізом ПЛР ампліконів генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 визначили методику виділення вірусної РНК і побудували теоретичні електрофореграми. Окреслили методику експрес – діагностики штамів H1N1 та H7N9 вірусу пташиного грипу А за генами HA, NA та NP.

4. При ідентифікації штаму H1N1, за ПДРФ-аналізом з використанням добраних рестриктаз до гену NP утворюються унікальні продукти розмірами 49–50, 348–350, 592–599 п.н..

5. Даний експрес-метод ПЛР – ПДРФ аналізу для ідентифікації штамів H1N1 та H7N9 вірусу дозволяє визначити точно поліморфізм у генах на осно-

ві порівняння довжин варіабельних ділянок РНК, потенційно маючих пошкоджені ген, дозволяє виявляти вірусний матеріал в одній реакційній суміші, скорочує час діагностики, відсоток фінансових витрат і технологічних похибок.

6. Встановлено, що метод експрес – діагностики ПЛР-ПДРФ здатний виявляти РНК вірус грипу А високопатогенного штаму H1N1 та низькопатогенного H7N9 з високими показниками чутливості (100 % чутливість).

Література

1. Chen, Y., Liang, W., Yang, S., Wu, N., Gao, H., Sheng, J. et. al. (2013). Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *The Lancet*, 381 (9881), 1916–1925. doi: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60903-4](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60903-4)
2. Gao, R., Cao, B., Hu, Y., Feng, Z., Wang, D., Hu, W. et. al. (2013). Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *New England Journal of Medicine*, 368 (20), 1888–1897. doi: <http://doi.org/10.1056/nejmoa1304459>
3. Neumann, G., Macken, C. A., Kawaoka, Y. (2014). Identification of Amino Acid Changes That May Have Been Critical for the Genesis of A(H7N9) Influenza Viruses. *Journal of Virology*, 88 (9), 4877–4896. doi: <http://doi.org/10.1128/jvi.00107-14>
4. Kageyama, T., Fujisaki, S., Takashita, E., Xu, H., Yamada, S., Uchida, Y. et. al. (2013). Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill*, 18 (16), 20453.
5. Zhang, Q., Shi, J., Deng, G., Guo, J., Zeng, X., He, X. et. al. (2013). H7N9 Influenza Viruses Are Transmissible in Ferrets by Respiratory Droplet. *Science*, 341 (6144), 410–414. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1240532>
6. Liu, C. Y., Ai, J. H. (2013). Virological characteristics of avian influenza A H7N9 virus. *Zhongguo Dang Dai ErKeZaZhi*, 15, 405–408.
7. Mei, Z., Lu, S., Wu, X., Shao, L., Hui, Y., Wang, J. et. al. (2013). Avian Influenza A(H7N9) Virus Infections, Shanghai, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (7), 1179–1181. doi: <http://doi.org/10.3201/eid1907.130523>
8. Lv, H., Han, J., Zhang, P., Lu, Y., Wen, D., Cai, J. et. al. (2013). Mild Illness in Avian Influenza A(H7N9) Virus–Infected Poultry Worker, Huzhou, China, April 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (11), 1885–1888. doi: <http://doi.org/10.3201/eid1911.130717>
9. Zhou, L., Tan, Y., Kang, M., Liu, F., Ren, R., Wang, Y. et. al. (2017). Preliminary Epidemiology of Human Infections with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 23 (8), 1355–1359. doi: <http://doi.org/10.3201/eid2308.170640>
10. Wang, D., Yang, L., Zhu, W., Zhang, Y., Zou, S., Bo, H. et. al. (2016). Two Outbreak Sources of Influenza A (H7N9) Viruses Have Been Established in China. *Journal of Virology*, 90 (12), 5561–5573. doi: <http://doi.org/10.1128/jvi.03173-15>
11. Chang, Y.-F., Wang, W.-H., Hong, Y.-W., Yuan, R.-Y., Chen, K.-H., Huang, Y.-W. et. al. (2018). Simple Strategy for Rapid and Sensitive Detection of Avian Influenza A H7N9 Virus Based on Intensity-Modulated SPR Biosensor and New Generated Antibody. *Analytical Chemistry*, 90 (3), 1861–1869. doi: <http://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03934>
12. Cheng, J., Wang, B., Jiang, X. (2014). Laboratory diagnosis of avian influenza virus H7N9 infection in a renal transplant recipient. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, 451–455.
13. Bouvier, N. M., Lowen, A. C. (2010). Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*, 2 (8), 1530–1563. doi: <http://doi.org/10.3390/v20801530>
14. Wang, W., Peng, H., Tao, Q., Zhao, X., Tang, H., Tang, Z. et. al. (2014). Serologic assay for avian-origin influenza A (H7N9) virus in adults of Shanghai, Guangzhou and Yunnan, China. *Journal of Clinical Virology*, 60 (3), 305–308. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.006>
15. Kageyama, T., Fujisaki, S., Takashita, E., Xu, H., Yamada, S., Uchida, Y. et. al. (2013). Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Eurosurveillance*, 18 (15). Available at: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.18.15.20453-en>
16. Garten, R., Davis, C., Russel, C. et. al. (2009). Antigen and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus circulating in humans. *Science*, 325 (5937), 197–201.
17. Yoon, J., Yun, S. G., Nam, J., Choi, S.-H., Lim, C. S. (2017). The use of saliva specimens for detection of influenza A and B viruses by rapid influenza diagnostic tests. *Journal of Virological Methods*, 243, 15–19. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.01.013>
18. Lee, M.-S., Chang, P.-C., Shien, J.-H., Cheng, M.-C., Shieh, H. K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 97 (1-2), 13–22. doi: [http://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00301-9](http://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00301-9)
19. Radecka, H., Radecki, J. (2016). Electrochemical Sensors for Detections of Influenza Viruses: Fundamentals and Applications. *Steps Forwards in Diagnosing and Controlling Influenza*. London. doi: <http://doi.org/10.5772/64423>
20. Wu, D., Zhang, J., Xu, F., Wen, X., Li, P., Zhang, X. et. al. (2017). A paper-based microfluidic Dot-ELISA system with smartphone for the detection of influenza A. *Microfluidics and Nanofluidics*, 21 (3). doi: <http://doi.org/10.1007/s10404-017-1879-6>
21. Cheng, C., Cui, H., Wu, J., Eda, S. (2017). A PCR-free point-of-care capacitive immunoassay for influenza A virus. *Microchimica Acta*, 184 (6), 1649–1657. doi: <http://doi.org/10.1007/s00604-017-2140-4>
22. Ge, Y., Zhou, Q., Zhao, K., Chi, Y., Liu, B., Min, X. et. al. (2017). Detection of influenza viruses by coupling multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with cascade invasive reaction using nanoparticles as a sensor. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2645–2656. doi: <http://doi.org/10.2147/ijn.s132670>

23. Karn-orachai, K., Sakamoto, K., Laocharoensuk, R., Bamrungsap, S., Songsivilai, S., Dharakul, T., Miki, K. (2016). Extrinsic surface-enhanced Raman scattering detection of influenza A virus enhanced by two-dimensional gold@silver core-shell nanoparticle arrays. RSC Advances, 6 (100), 97791–97799. doi: <http://doi.org/10.1039/c6ra17143e>

Received date 21.05.2019

Accepted date 05.06.2019

Published date 30.06.2019

Буряченко Семен Васильович, аспірант, Відділ вивчення хвороб птиці, Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України, вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023
E-mail: semenb837@gmail.com

Стегній Борис Тимофійович, доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України, завідувач лабораторії, Лабораторія вивчення вірусних хвороб птиці, Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України
вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023

УДК 635.952.2:581.4+581.1

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.179207

ІНТРОДУКЦІЯ ТА АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ *PITTOSPORUM TENUIFOLIUM* GAERTN. В УМОВАХ ЗАХИЩЕНОГО ҐРУНТУ

Л. І. Бойко

Мета досліджень – вивчити комплекс біологічних показників, анатомічну та фізіологічну специфіку рослин виду *P. tenuifolium* Gaertn., що є критеріями їх адаптаційних можливостей в нових умовах.

Низкою дослідників розглядалися питання адаптації в умовах промислового інтер'єру окремих видів та груп рослин. Відомості щодо досліджень адаптивного потенціалу стосовно видів роду *Pittosporum* досить обмежені. Зустрічаються лише фрагментарні відомості щодо біологічних особливостей деяких видів роду (Тумак, Паламар 2007; Бойко, 2015, 2016, 2018; Larsen, 1979; Tranguillini, 1964). Оскільки дослідження такого напрямку для виду *P. tenuifolium*, практично відсутні, питання виявлення адаптивних можливостей рослин виду набувають актуальності.

Об'єктом досліджень було обрано рослини виду *Pittosporum tenuifolium*

У роботі застосовувалися фенологічний, порівняльний та морфолого-анатомічний методи досліджень.

За результатами фенологічних спостережень у рослин виду *Pittosporum tenuifolium* виявлено адаптивні зміни, які реалізуються через настання вимушеного спокою та варіювання термінів настання і тривалості цього періоду, що детерміновано умовами утримання.

Порівняльний аналіз морфометричних показників пагону та листка у рослин при вирощуванні в умовах інтер'єрів, що різнилися за мікрокліматичними умовами виявив морфозміни, що проявлялися у темпах річного приросту, зміні кількості новоутворених листків, розмірів листкових пластинок, довжині міжвузля.

В анатомічній будові листка виявлено збільшення товщини адаксіальної епідерми на 32,5 %; зменшення товщини листка на 8 %. Виявлено зростання коефіцієнту палісадності, що супроводжувалося перерозподілом між зубчастим і стовпчастим мезофілом. Адаптація на фізіолого-біохімічному рівні проявлялася у зміні кількісних показників вмісту пластидних пігментів та їх співвідношення.

Висновки. Оцінка еколого-біологічних, морфолого-анатомічних та фізіологічних особливостей *Pittosporum tenuifolium* виявила адаптивні зміни, що реалізуються через настання вимушеного спокою та варіювання термінів настання і тривалості цього періоду, морфолого-анатомічні структурні зміни в будові пагона та листкової пластинки, зміну кількісних показників вмісту пластидних пігментів та їх співвідношення. Виявлені зміни сприяють підвищенню стійкості рослин *Pittosporum tenuifolium* в змінених умовах існування

Ключові слова: *Pittosporum tenuifolium*, адаптація, листок, пагін, спокій, анатомічна будова, пігменти, стійкість

Copyright © 2019, L. Boyko.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).