

## ORIGINALAN RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 57.083.2:616.988.73:636.5.09

**IDENTIFIKACIJA IZOLOVANIH SOJEVA VIRUSA ATIPIČNE  
KUGE ŽIVINE PRIMENOM MOLEKULARNIH METODA  
VIRUSOLOŠKE DIJAGNOSTIKE\******IDENTIFICATION OF ISOLATED VIRAL STRAINS OF ATYPICAL  
AVIAN INFLUENZA USING MOLECULAR METHODS OF VIROLOGICAL  
DIAGNOSTICS*****D. Vidanović, M. Šekler, N. Vasković, A. Žarković, K. Matović, N. Milić,  
J. Nišavić\*\***

*Pored primene standardnih metoda virusološke dijagnostike koje se koriste za izolovanje virusa Newcastle bolesti iz suspektnog materijala kao i za njegovu identifikaciju, danas su sve više u upotrebi i molekularne metode dijagnostike i to pre svega lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) i metoda sekvenciranja. Cilj ovog rada bio je ispitivanje mogućnosti primene navedenih metoda u dijagnostici infekcije živine izazvane virusom Newcastle bolesti. Prisustvo hemaglutinacionih antigena virusa Newcastle bolesti ustanovljeno je u uzorcima alantoične tečnosti od 62 embrionirana jaja živine posle 72h od inokulacije čiji su se titri kretali od 1:16 do 1:2048, dok je testom heminhibicije (HI testom) uz primenu referentnog imunog seruma protiv navedenog uzročnika izvršena identifikacija izolovanih virusa u razređenjima seruma od 1:128 do 1:1024. Metodom reverzne transkripcije (RT-PCT) i lančane reakcije polimeraze (PCR) ustanovljeno da se kod osam ispitivanih uzoraka formira po jedan fragment virusne RNK u gelu agaroze veličine od 254bp koji je po sekvenci nukleotida karakterističan za genom virusa Newcastle bolesti. Na osnovu uporedne analize sekvenci RNK dobijenih od osam izolovanih sojeva virusa NDV i sekvenci genoma referentnih sojeva virusa atipične kuge živine uz korišćenje Mega 40 i BLAST programa, utvrđeno je da su izolovani sojevi virusa Newcastle bolesti visoko virulentni.*

*Ključne reči: virus Newcastle bolesti, embrionirana jaja, test hemaglutinacije, test inhibicije hemaglutinacije, RT-PCR, sekvenciranje*

\* Rad primljen za štampu 19. 11. 2008. godine

\*\* Mr sci. med. vet. Dejan Vidanović, mr sci. med. vet. Milanko Šekler, Nikola Vasković dr vet. med., mr sci. med. vet. Aleksandar Žarković, mr sci. med. vet. Kazimir Matović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo; dr sci. med. vet. Nenad Milić, vanredni profesor, Jakov Nišavić, dr vet. med. Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

## Uvod / Introduction

Virus Newcastle bolesti izaziva atipičnu kugu peradi koja se manifestuje kao perakutno, akutno, subakutno i hronično infektivno oboljenje kokošaka, ćuraka, morki, pataka, gusaka, golubova, fazana, jarebica, vrana i drugih divljih ptica. Infekcija živine nastaje preko kontaminirane hrane, vode i opreme koja se koristi za uzgoj. Virus se odlikuje znatnom varijabilnošću u pogledu virulencije tako da može izazvati različita oboljenja u koje spadaju:

1) viscerotropna velogena forma bolesti u vidu akutne letalne infekcije svih starosnih kategorija živine koja se manifestuje pojavom hemoragičnih lezija u digestivnom sistemu;

2) neurotropna velogena forma bolesti koja se ispoljava promenama na respiratornom sistemu i nervnom sistemu inficiranih jedinki;

3) mezogena forma bolesti koja se javlja uglavnom kod mlađih kategorija živine i praćena je visokim stepenom mortaliteta;

4) lentogena forma bolesti koja se ispoljava kao inaparentna respiratorna infekcija izazvana slabovirulentnim ili avirulentnim lentogenim sojevima virusa od kojih se pripremaju vakcine.

5) asimptomatska enterična forma sa promenama u digestivnom sistemu inficirane živine izazvana je lentogenim sojevima virusa Newcastle bolesti i najčešće protiče bez ispoljavanja kliničkih simptoma oboljenja.

S obzirom da atipična kuga živine nanosi značajne ekonomske štete živinarskoj proizvodnji, danas se za prevenciju ovog oboljenja koriste vakcine pripremljene od mezogenih i lentogenih sojeva virusa Newcastle bolesti. Cilj našeg ispitivanja je bio da se pored primene standardnih metoda virusološke dijagnostike koje se koriste u izolaciji i identifikaciji virusa Newcastle bolesti, ispita i mogućnost primene molekularnih metoda u dijagnostici navedene infekcije živine.

## Materijal i metode rada / Materials and methods

### Materijal / Material

#### Uzorci / Samples

Ukupno 36 uzoraka unutrašnjih organa živine (mozak, jetra, slezina, pluća, creva) sa sedam različitih lokacija na teritoriji Republike Srbije, pripremljeno je za ispitivanje na prisustvo virusa Newcastle bolesti tokom vremenskog perioda od oktobra do decembra 2006.godine.

#### Referentni soj virusa Newcastle bolesti / Referent Newcastle disease viral strain

U ispitivanjima je korišćen referentni soj virusa Newcastle bolesti, La Sota, umnožen u kokošijim embrionima, infektivnog titra od  $10^6$ EID<sub>50</sub> i hemaglutinacionog titra od 64 HJ/0,1ml.

*Embrionirana jaja / Embryoed eggs*

Za izolaciju virusa Newcastle bolesti iz uzoraka suspektnog materijala poreklom od živine korišćena su embrionirana jaja stara 9-11 dana. Ukupno je inokulisano 120 embrioniranih jaja.

*Imuni serum / Immune serum*

Za izvođenje testa inhibicije hemaglutinacije korišćen je referentni imuni serum protiv virusa Newcastle bolesti titra od 1:256 (Veterinary Laboratory Agency, Velika Britanija).

*Mini kit za ekstrakciju RNK virusa Newcastle bolesti /*

*Mini kit for extraction of RNA of Newcastle disease virus*

Za ekstrakciju virusne RNK iz pripremljenih uzoraka alantoisne tečnosti poreklom iz inokuliranih embrioniranih jaja korišćen je QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Nemačka).

*Dijagnostički kit i prajmeri za izvođenje reverzne transkripcije RNK i lančane reakcije polimeraze / Diagnostic kit and primers for reverse transcription of RNA and polymerase chain reaction*

Za izvođenje metode reverzne transkripcije RNK i lančane reakcije polimeraze korišćeni su One Step RT-PCR kit (Applied Biosystems, SAD) i jedan par prajmera koji amplifikuju deo gena na molekulu RNK koji kodira sintezu fuzionog F proteina spoljašnjeg omotača virusa NDV i to: "forward" prajmer 5-CCTTGGTGAITCTATCCGIAG-3 i "reverse" prajmer 5-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3 (Seal i sar., 1995).

*Dijagnostički kit za sekvenciranje izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti / Diagnostic kit for sequencing of isolated Newcastle disease viral strains*

Za izvođenje metode sekvenciranja izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti korišćen je BigDye terminator kit v. 3.1 (Applied Biosystems, SAD).

**Metode / Methods**

*Inokulacija uzoraka suspektnog materijala poreklom od živine /*

*Inoculation of samples of suspect material originating from poultry*

Uzorci tkiva živine uginule sa kliničkim simptomima Newcastle bolesti su posle obrade inokulisani alantoisnu šupljinu embrioniranih jaja starih 9-11 dana po standardnoj proceduri. (OIE priručnik, 2008).

*Test hemaglutinacije / Hemagglutination test*

U sva udubljenja mikrotitracionih ploča sa „V“ dnom, najpre je sipano po 25 µL rastvarača PBS-a. U prva udubljenja mikrotitracionih ploča je zatim davano po 25 µl suspenzije alantoisne tečnosti poreklom od inokuliranih pilećih embriona. Ove dve tečnosti su izmešane, a zatim je mešavina u količini od po

25  $\mu$ L tečnosti prenošena u sledeća udubljenja mikrotitracione ploče i tako sve do 11. bazenčića iz koga je količina od po 25  $\mu$ L tečnosti izbačena. U sva udubljenja je posle pripreme osnovnog razređenja dodavano po 25  $\mu$ L PBS-a kako bi se dobila količina od po 50  $\mu$ L tečnosti u svakom bazenčiću i razređenje alantoinne tečnosti odnosno umnoženog virusa od 1:2 do 1:4096. U sve bazenčiće mikrotitracione ploče je zatim dodavano po 25  $\mu$ L 1% suspenzije kokošijih eritrocita. Posle inkubacije u vremenskom periodu od 40 minuta na sobnoj temperaturi, vršeno je očitavanje rezultata. (OIE priručnik, 2008).

*Test inhibicije hemaglutinacije (HI test) / Hemagglutination inhibition test (HI test)*

U sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano je po 25  $\mu$ L PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikrotitracione ploče pojedinačno dodato po 25  $\mu$ L referentnog imunog seruma protiv virusa Newcastle bolesti, koji su prvo izmešani sa rastvaračem, a zatim su u količini od po 25  $\mu$ L preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:4096. U sva udubljenja su zatim dodati uzorci od po 25  $\mu$ L suspenzije alantoinne tečnosti koja je pokazala jasnu hemaglutinacionu aktivnost i čiji je titar podešen na 4 H.J. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su inkubisane u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi posle čega je u sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano po 25  $\mu$ L 1% suspenzije kokošijih eritrocita. Posle 40 minuta, inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, vršeno je očitavanje rezultata. (OIE priručnik, 2008).

*Ekstrakcija virusne RNK / Extraction of viral RNA*

Ekstrakcija virusne RNK iz pripremljenih uzoraka alantoinne tečnosti poreklom iz embrioniranih jaja vršena je primenom QIAamp Viral RNA mini kita (Qiagen, Nemačka) po proceduri opisanoj od strane proizvođača.

*Reakcija reverzne transkripcije i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) /*

*Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Za izvođenje reakcije reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze korišćena je smeša za RT-PCR koja se sastojala od 12,5  $\mu$ L 2X Master Mix-a, 0,625  $\mu$ L 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix-a, 0,2  $\mu$ L 50 mM "Forward" prajmera, 0,2  $\mu$ L 50 mM "Reverse" prajmera, 6,48  $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O i 5  $\mu$ L ekstrakta RNK.

Reakcija reverzne transkripcije odvijala se na temperaturi od 50°C u vremenskom periodu od 30 minuta, a denaturacija i aktivacija termostabilne polimeraze na temperaturi od 95°C u trajanju od 15 minuta. Izvođenje navedene metode je obuhvatalo i četrdeset ciklusa denaturacije na temperaturi od 94°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera na temperaturi od 50°C u trajanju od 30 sekundi i elongaciju na temperaturi od 72°C u trajanju od 1 minut. Finalna elongacija PCR produkata se odvijala na temperaturi od 72°C u vremenskom periodu od 7 minuta.

*Izvođenje metode horizontalne gel elektroforeze /*

*Method of horizontal gel electrophoresis*

Dobijeni PCR produkti, u količini od po 20 µL, korišćeni su za izvođenje reakcije horizontalne gel elektroforeze u 1 % agaroznom gelu (Invitrogen, SAD). Bojenje agaroze vršeno je etidijum bromidom, a vizuelizacija dobijenih PCR produkata vršena je u GelDoc sistemu (Bio-Rad, SAD). Prečišćavanje PCR proizvoda je zatim vršeno korišćenjem Qiaquick gel Extraction kita (Qiagen, Nemačka).

*Izvođenje metode sekvenciranja dobijenih sojeva virusa Newcastle bolesti /*

*Method of sequencing of obtained Newcastle disease viral strains*

Prečišćeni PCR produkti su korišćeni kao templat u reakciji sekvenciranja sa BigDye terminator kitom v. 3.1 (Applied Biosystems, SAD). Smeša za sekvenciranje u konačnoj zapremini od 20 µl imala je sledeći sastav:

Ready reaction premix	4 µL
BigDye sequencing buffer	2 µL
Prajmer (3.2 pMol)	1 µL
Template	10 µL
H <sub>2</sub> O	3 µL

Prečišćavanje PCR produkata je vršeno u Centrisept kolonama (Prenclinton, USA). Prečišćeni proizvodi sekvenciranja su pomešani sa HI-DI formamidom u odnosu 1:1 i posle toga sipani u bazenčiće mikrotitracione ploče u količini od po 16 µL. Metoda elektroforeze je izvođena u aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), a dobijene sekvence su obrađivane primenom kompjuterskih programa Sequencing Analysis 5.2 i Mega 4.0. Konsenzus sekvence nukleotida u sastavu F-gena su primenom BLAST programa upoređivane sa nukleotidnim sekvencama u sastavu navedenog gena drugih sojeva virusa Newcastle bolesti koje se nalaze u banci gena.

*Identifikacija sojeva virusa Newcastle bolesti na osnovu njihove virulencije primenom molekularnih metoda / Identification of Newcastle disease viral strains based on their virulence using molecular methods*

Sekvence nukleotida odgovorne za kodiranje sinteze fuzionog F-proteina su pomoću Transek (Transeq) programa prevođene u odgovarajuće sekvence aminokiselina koje određuju primarnu strukturu pomenutog antigena. Prema podacima iz OIE priručnika za 2008. godinu smatra se da su visokovirulentni sojevi virusa Newcastle bolesti oni koji imaju bazne kiseline (lizin – K ili arginin – R) na pozicijama 113, 115 i 116, odnosno ako je njihov redosled na C terminalnom kraju F2 subjedinice <sup>112</sup>R/K-R-Q-K/R-R<sup>116</sup> i ako poseduju fenilalanin na poziciji 117. Svi sojevi virusa Newcastle bolesti koji imaju redosled aminokiselina <sup>112</sup>G/E-K/R-Q-G/E-R<sup>116</sup> i L (leucin) na poziciji 117 su nisko virulentni.

## Rezultati / Results

Posle 72h od inokulacije uzoraka suspektnog materijala u embrionirana jaja kokoši utvrđeno je uginuće 62 embriona. U alantoisnoj tečnosti uginulih embriona primenom testa hemaglutinacije ustanovljeno je prisustvo hemaglutinacionih antigena virusa Newcastle bolesti čiji su se titri kretali od 1:16 do 1:2048 (tabela 1).

Tabela 1. *Rezultati testa hemaglutinacije (HA test) /*  
Table 1. Results of hemagglutination test (HA test)

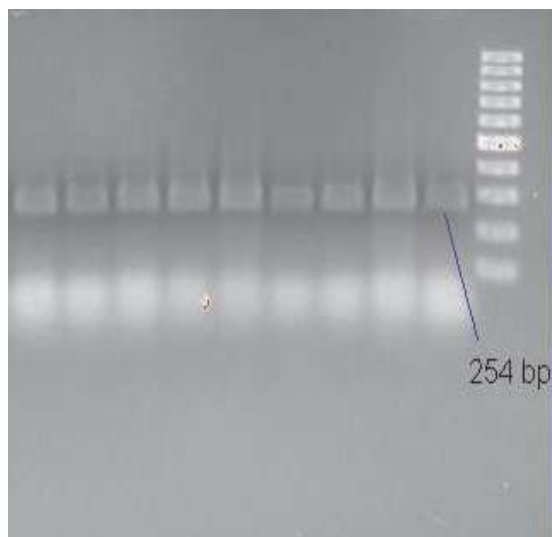
Uzorci alantoisne tečnosti / <i>Samples of allantoic liquid</i>	Vrednosti titra hemaglutinacije / <i>Values of hemagglutination titer</i> (HJ/01 ml)
1.	1:16
2.	1:64
3.	1:128
4.	1:64
5.	1:512
6.	1:256
7.	1:2048
8.	1:128

Posle tretiranja uzoraka alantoisne tečnosti razređenjima referentnog imunog seruma, izostala je pojava aglutinacije kokošijih eritrocita u razređenjima seruma od 1:128 do 1:1024, čime je izvršena identifikacija virusa Newcastle bolesti u ispitivanim uzorcima (tabela 2).

Tabela 2. *Rezultati testa inhibicije hemaglutinacije (HI test) /*  
Table 2. Results of hemagglutination inhibition test (HI test).

Uzorci alantoisne tečnosti / <i>Samples of allantoic liquid</i>	Vrednosti titra inhibicije hemaglutinacije / <i>Values of</i> <i>hemagglutination inhibition titer</i>
1.	1:512
2.	1:256
3.	1:128
4.	1:1024
5.	1:512
6.	1:1024
7.	1:512
8.	1:1024

Rezultati dobijeni metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze pokazali su da se kod osam ispitivanih uzoraka formira po jedan fragment virusne RNK u gelu agaroze, veličine od 254 bp koji je po sekvenci nukleotida karakterističan za genom virusa atipične kuge živine (slika 1).



Slika 1. RNK fragmenti referentnog i izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti /  
*Figure 1. RNA fragments of referent and isolated strains of Newcastle disease virus*

Sekvence nukleotida dobijene „forward“ i „reverse“ prajmerima su upoređivane sa sekvencama genoma pojedinih sojeva virusa Newcastle bolesti korišćenjem Mega 4.0 programa. Uporednom analizom dobijenih sekvenci RNK poreklom od osam izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti i sekvenci genoma referentnih sojeva virusa atipične kuge peradi uz korišćenje Mega 4.0 i BLAST programa, potvrđeno je da se radi o virusu Newcastle bolesti.

Sekvence nukleotida u sastavu gena koji kodira sintezu fuzionog F-proteina spoljašnjeg omotača virusa Newcastle bolesti prevedene su u redosled aminokiselina koji je imao sledeći sastav:

FYPEIQRSVSTSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLK  
ESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAE (slika 2). Karakterističan redosled i prisustvo više baznih aminokiselina na mestu cepanja Fo proteina <sup>112</sup>RRQKR<sup>116</sup> i prisustvo F (fenilalanina) na poziciji 117 <sup>117</sup>FIG<sup>119</sup> potvrdili su da su izolovani sojevi virusa Newcastle bolesti visokovirulentni (OIE Manual, 2008).



Position	Amino Acid Sequence
6679	FFGDSIRRSKGLCLTSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
6764	FFGDSIRRSKGLCLTSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILPLKESIAATNEAVHEVTHGLSQLAV
6987	FFGDSIRRSKGLC?TSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
7092	?LGESIRRSKGLC?TSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILPLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
7220	FFGDSIRRSKGLCLTSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
7221	?FGDSIRRSKGLC?TSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
7222	?FGDSIRRSKGLC?TSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV
7514	FFGDSIRRSKGLCLTSGGRRQKRFIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAV

Slika 2. Sekvenca aminokiselina izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti /  
Figure 2. Amino acid sequence of isolated strains of Newcastle disease virus

### Zaključak i diskusija / Conclusion and Discussion

Pored primene standardnih metoda virusološke dijagnostike koje se koriste za izolaciju i identifikaciju virusa Newcastle bolesti danas se u navedene svrhe sve više primenjuju molekularne metode i to pre svega lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) i metoda sekvenciranja genoma virusa (Aldous i sar., 2001). S obzirom na to da postoje značajne razlike u virulenciji između pojedinih sojeva virusa Newcastle bolesti, prema kriterijumima OIE-a je, pored dokazivanja prisustva navedenog uzročnika u suspektom materijalu primenom standardnih virusoloških metoda, potrebno izvršiti i identifikaciju izolovanih sojeva virusa na osnovu karakteristika njihovih genoma i stepena virulencije primenom molekularnih metoda virusološke dijagnostike. Analizom redosleda nukleotida u sastavu F-gena na mestu njegovog cepanja, odnosno redosleda aminokiselina čiju sintezu kodiraju određene sekvence pomenutog gena, moguće je precizno utvrditi da li se radi o visoko ili nisko virulentnim sojevima virusa Newcastle bolesti (Leeuw i sar., 2005; OIE Manual, 2008). Iz tih razloga je neophodno koristiti navedene metode koje omogućavaju identifikaciju izolovanih sojeva virusa Newcastle bolesti živine primenom metode sekvenciranja radi determinacije nukleotidnih sekvenci koje određuju antigensku specifičnost njihovih fuzionih antigena i od kojih zavisi i virulencija pomenutog uzročnika. (OIE Manual, 2008).



**Literatura / References**

1. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. 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): 239-57.
2. Aldous W, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology* 2001; 30: 117-28.
3. Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology* 1993; 128: 363-70.
4. Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype-1 from field cases using one-step reverse transcriptase – polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 2002; 31: 493-9.
5. Gohm DS, Thür B, Hofmann MA. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathology* 2000; 29: 143-52.
6. Herczeg J, Pascucci S, Massi P, Luini M, Selli L, Capua I, Lomniczil B. A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathology* 2001; 30: 163-8.
7. Leeuw OS, de Guus Koch, Leo Hartog, Niek Ravenshorst, Ben PH Peeters. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *Journal of General Virology* 2005; 86: 1759-69.
8. Lien Yi-Yang, Jai-Wei Lee, Hung-Yi Su, Hsiang-Jung Tsai, Ming-Cheng Tsai, Chia-Yu Hsieh, Shinn-Shyong Tsai. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003–2006. *Veterinary Microbiology* 2007, 123: 194-202.
9. Li Yu, Zhiliang Wang, Yihai Jiang, Leo Chang, Jimmy Kwang. Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Virus Isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 3512-9.
10. Lee Youn Jeong, Haan Woo Sung, Jun Gu Choi, Jae Hong Kim, Chang Seon Song. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathology* 2004; 33: 482-91.
11. Panda Aruna, Zhuhui Huang, Subbiah Elankumaran, Daniel D. Rockemann, Siba K. Sarmal. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis* 2004; 36:1-10.
12. Seal B, King D, Bennett J. Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates by Reverse Transcription PCR Coupled to Direct Nucleotide Sequencing and Development of Sequence Database for Pathotype Prediction and Molecular Epidemiological Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 2624-30.
13. Tiwari K, Kataria RS, Nanthakumar T, Dash BB, Desai G. Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 2004; 27: 163-9.

ENGLISH

**IDENTIFICATION OF ISOLATED VIRAL STRAINS OF ATYPICAL AVIAN INFLUENZA USING MOLECULAR METHODS OF VIROLOGICAL DIAGNOSTICS**

**D. Vidanović, M. Sekler, N. Vasković, A. Žarković, K. Matović, N. Milić, J. Nišavić**

In addition to the implementation of standard methods of virological diagnostics used for the isolation of the Newcastle disease virus from suspect material, as well as for its identification, nowadays there is increasing use of molecular diagnostic methods, primarily reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the sequencing method. The objective of this work was to examine possibilities for the implementation of the above methods in the diagnosis of poultry infection caused by the Newcastle disease virus. The presence of hemagglutination antigens for the Newcastle disease virus was established in samples of allantoic liquid from 62 poultry embryoed eggs 72 h after inoculation, whose titers ranged from 1:16 to 1:2048, while the hemagglutination inhibition test (HI test) with the implementation of a referent immuno serum against the given cause provided the identification of isolated viruses in serum dilutions of 1:128 to 1:1024. The RT-PCR method and the PCR established that in eight examined samples one fragment each of viral RNA is formed in agarose gel of a size of 254bp, which is characteristic for the Newcastle disease virus genome according to its nucleotide sequence. On the grounds of a comparative analysis of RNA sequences obtained from eight isolated NDV strains and the genome sequences of referent atypical poultry influenza viral strains using Mega 40 and BLAST programmes, it was established that the isolated strains of the Newcastle disease virus were highly virulent.

Key words: Newcastle disease virus, embryoed eggs, hemagglutination test, hemagglutination inhibition test, RT-PCR, sequencing.

РУССКИЙ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА АТИПИЧНОЙ ЧУМЫ ДОМАШНИХ ПТИЦ ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИЯГНОСТИКИ**

**Д. Виданович, М. Шеклер, Н. Васкович, А. Жаркович, К. Матович, Н. Милич, И. Нишавич**

Наряду с применением стандартных методов вирусологической диагностики, пользующиеся для изолирования вируса Ньюкасла болезни из подозрительного материала словно и для его идентификации, в настоящее время всё больше в употреблении и молекулярные методы диагностики а именно прежде всего цепная реакция полимеразы (РТ-ПЦР) и метода секвенцирования. Цель этой работы была испытание возможности применения приведённых методов в диагностике инфекции домашних птиц, вызванной вирусом Ньюкасла болезни. Присутствие гемагглютинационных антигенов вируса Ньюкасла болезни установлено нами в образчиках алантоисной жидкости от 62 эмбрионированных яиц домашних птиц после 72 ч. от инокуляции чьи титры двигались от 1:16 до 1:2048, пока тестом химторможения (ХТ

тестом) при применении референтного иммунного сыворотки против приведённого возбудителя совершена идентификация изолированных вирусов в разрежённых сыворотки от 1:128 до 1:1024. Методом реверсивной транскрипции (РТ-ПЦТ) и цепной реакции полимеразы (ПЦР) установлено нами, что у восьми испытанных образчиков формируется по один фрагмент вирусной РНК в геле агарозы величиной от 254 бп, который по секвенце нуклеотидов характерный для генома вируса Ньюкасла болезни. На основе сравнительного анализа секвенц РНК, полученных из восьми изолированных штаммов вируса НДВ и секвенц генома референтных штаммов вируса атипичной чумы домашних птиц при пользовании Мега 40 и БЛАСТ программы, утверждено нами, что изолированные штаммы вируса Ньюкасла болезни высоко вирулентны.

Ключевые слова: Вирус Ньюкасла болезни, эмбрионированные яйца, тест гемагглютинации, тест торможения гемагглютинации, РТ-ПЦР, секвенирование