

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ORF7 SEQUENCES FROM PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ISOLATES

Tkachik T.E.¹, Tolkova E.S.² (Russian Federation) Email: Tkachik548@scientifictext.ru

¹Tkachik Timofey Eduardovich - PhD in Biology, Head;
²Tolkova Ekaterina Sergeevna – Specialist,
CENTRE OF GENOMICS AND MOLECULAR BIOLOGY,
LLC RTC “CHERKIZOVO”,
MOSCOW

Abstract: the aim of this study was to evaluate genetic variability of ORF7 of recent PRRSV isolates obtained from various farms in Russian Federation by performing phylogenetic analysis of sequences. Overall, 32 full sequences of ORF7 were obtained. Alignment was performed for nucleotide sequences and amino acid sequences. For nucleotide sequence alignment phylogenetic tree was constructed. Phylogenetic analysis showed that type 1 PRRSV isolates belonged to subtype 1. Type 2 PRRSV isolates most closely resembled Ingelvac® PRRS MLV vaccine strain which corresponds with previously published data. Amino acid sequence alignment showed only single amino acid substitutions.

Keywords: PRRS, ORF7, capillary electrophoresis, phylogenetic analysis.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ ПО ГЕНУ ORF7

Ткачик Т.Э.¹, Толькова Е.С.² (Российская Федерация)

¹Ткачик Тимофей Эдуардович - кандидат биологических наук, руководитель;
²Толькова Екатерина Сергеевна - специалист,
Центр геномики и молекулярной биологии,
ООО Научно-испытательный центр «ЧЕРКИЗОВО»,
г. Москва

Аннотация: целью данного исследования было оценить вариабельность гена ORF7 изолятов вируса РРСС, выделенных со свиноферм в различных регионах Российской Федерации. Было получено в общей сложности 32 полных сиквенса ORF7. Проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей с последующим построением дендрограмм и выравнивание аминокислотных последовательностей. Филогенетический анализ показал, что изоляты вируса РРСС 1-го типа относились к 1 подтипу. Изоляты вируса РРСС 2-го типа генетически были наиболее близки к штамму вакцины Ingelvac® PRRS MLV, что согласуется с ранее опубликованными данными. Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что рассмотренные изоляты характеризуются только одиночными заменами аминокислот.

Ключевые слова: РРСС, ORF7, секвенирование, филогенетический анализ.

Введение

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) – высоко-контагиозное заболевание, характеризующееся массовыми абортами у свиноматок, рождением нежизнеспособных поросят, а также респираторными осложнениями и повышенной смертностью поросят вскоре после рождения [11]. В 2012 году экономические потери, ассоциированные с РРСС, были оценены в Европе в размере 126 евро на свиноматку [9].

Вирус, вызывающий РРСС, впервые был идентифицирован в Голландии в 1991 году [17]. Вирус РРСС содержит одноцепочечную РНК позитивной полярности, покрыт оболочкой и имеет сферическую форму. Его относят к отряду Nidovirales, семейству Arteriviridae, роду Arterivirus [3]. Геном составляет 15-15,5 тысячи нуклеотидов в длину и содержит 10 перекрывающихся рамок считывания (open reading frame, ORF) [8]. Открытые рамки считывания 1a и 1b кодируют неструктурные белки (non-structural proteins, Nsp). ORF 2a, 2b, 3, 4, 5, 5a, 6 и 7 кодируют структурные белки GP2, E, GP3, GP4, GP5, GP5a, M и N соответственно [16].

В настоящее время вирус РРСС подразделили на два генотипа – тип 1 (ранее известный как европейский) и тип 2 (ранее известный как североамериканский) [10], прототипами которых являются соответственно штамм Lelystad и штамм VR-2332 [3]. Эти 2 генотипа вируса имеют от 50 до 60% гомологии на нуклеотидном уровне [17].

На сегодняшний день РРСС – заболевание, регистрируемое практически на всех континентах с развитым промышленным свиноводством, и оба генотипа представлены как на европейском, так и на американском континентах [10].

Вирус РРСС 1-го типа был идентифицирован в США в 1999 году [5], а затем в четырех других неевропейских странах – Канаде [2], Северной Корее [7], Тайланде [15] и Китае [16].

Вирус РРСС 2-го типа появился в Европе в 1996 году, вероятно в связи с использованием живой вакцины [6]. Кроме штамма, зарегистрированного в Венгрии [1], все опубликованные сиквенсы изолятов 2-го типа вируса РРСС в Европе имели высокий процент идентичности с вакциной Ingelvac® PRRSV MLV [6]. Вирус РРСС второго типа также распространен в большинстве азиатских стран [16].

Первоначально предполагалось, что вирусы РРСС 2-го типа обладают большей генетической вариабельностью [4], однако последующие исследования показали обратное [13].

Основываясь на сиквенсах ORF5 и ORF7 вируса 1-го типа, полученных в Восточной Европе, было предложено разделить тип 1 на 3 подтипа [14]. Далее был обнаружен полиморфизм размера ORF7, который подтвердил существование подтипов [13]. Впоследствии было предложено существование 4 подтипа [14]. В Западной Европе до сих пор идентифицировали только подтип 1 [12].

Из всех открытых рамок считывания вируса РРСС, участок ORF1b, соответствующий Nsp2, ORF5, кодирующая GP5, и ORF7, кодирующая белок нуклеокапсида (N), отличаются наибольшей генетической вариабельностью [16] и часто используются для филогенетического анализа. Молекулярно-генетическое типирование изолятов вируса позволяет определять штамм циркулирующего в определенном регионе вируса, отслеживать случаи реверсии вакцинного штамма, анализировать степень гомологии циркулирующих в хозяйствах штаммов вируса, тем самым давая возможность выяснить путь попадания вируса в хозяйство и предотвратить его дальнейшее распространение.

Материалы и методы

Обратная транскрипция и ПЦР. РНК образцов, определенных как положительные по РРСС, была выделена набором МАГНО-сорб (АмплиСенс) автоматическим способом на приборе KingFisher FLEX с модифицированным протоколом. Обратная транскрипция проводилась набором Реверта-L (АмплиСенс) согласно инструкции производителя. Полученная кДНК в объеме 5 мкл использовалась для амплификации ORF7 с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS (Евроген) согласно инструкции производителя. Перечень используемых праймеров представлен в таблице 1.

Амплификация проводилась на термоджеле ProFlex PCR System (Applied Biosystems) по следующей программе: денатурация 95°C в течение 3 минут; затем 35 циклов денатурации при 95°C в течение 10 секунд, отжиг при 58°C в течение 30 секунд, и элонгация при 72°C в течение 10 секунд. По окончании всех циклов последняя элонгация проводилась при 72°C в течение 5 минут. Наличие ПЦР-продукта было подтверждено электрофоретической детекцией в 1,5% агарозном геле с этидиумом бромидом. ПЦР-продукт затем хранился при 4°C до последующего использования.

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации ORF7 вируса РРСС 1 и 2 типа

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина продукта	Ссылка
ORF7 1-го типа	CCCCTGCCCAICACG	TCGCCСТААТТГААТАГГТГА	635	[87]
ORF7 2-го типа	GCAGGCTTTСАТССGATT	TCGCCСТААТТГААТАГГТГА	633	*

* Прямой праймер разработан для данной работы; обратный праймер из [87]

Секвенирование. Очистка продукта ПЦР проводилась реагентом ExoSAP-IT™ (Affymetrix). Сиквенсовая реакция проводилась с использованием набора реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Очистка продукта сиквенсовой реакции проводилась набором BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems™). Все манипуляции осуществлялись согласно инструкциям производителей.

Секвенирование проводилось на секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с прямым и обратным праймером для каждого образца.

Результаты

Было получено в общей сложности 32 сиквенса ORF7.

Сиквенсы ORF7 1-го типа сравнивались с сиквенсами ORF7 штаммов Lelystad (GenBank accession no. M96262.2), VP-046 bis (вакцина Amervac® PRRS, GenBank accession no. GU067771.1) и DV (вакцина Porcilis® PRRS, GenBank accession no. KF991509.2). Для определения, содержит ли изолят штамм вакцинного или дикого типа, был принят порог процента идентичности 99% [113]. Далее анализировались только изоляты «дикого» типа РРСС. Филогенетическое дерево изолятов «дикого» типа вируса было построено методом наибольшего сходства (Maximum Likelihood) [112] и представлено на рисунке 1.

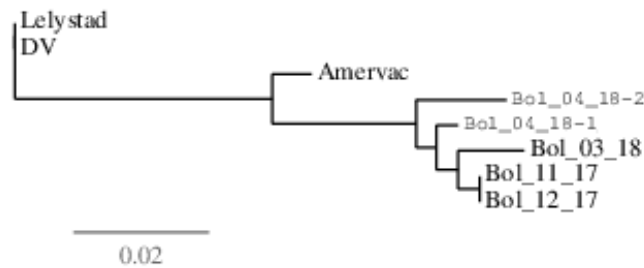


Рис. 1. Филогенетическое дерево ORF7 1-го типа вируса PPCC. Длина ветвей пропорциональна количеству замен. Сиквенс штамма VP-046 bis (вакцина Amervac® PRRS) условно обозначен как Amervac

Согласно филогенетическому дереву, можно сделать вывод, что исследованные изоляты относятся к первому подтипу вируса PPCC 1-го типа и генетически наиболее близки к штамму вакцины Amervac, используемому на площадке.

Выравнивание аминокислотных последовательностей ORF7 1-го типа вируса PPCC представлено на рисунке 2. По выравниванию видно, что рассмотренные изоляты характеризуется только одиночными заменами аминокислот. Ряд этих замен, однако, находятся на участках эпитопов.

Сиквенсы ORF7 вируса PPCC 2-го типа сравнивались с референсными сиквенсами, представленными в таблице 2.

Таблица 2. Референсные сиквенсы 2-го типа вируса PPCC, использованные для сравнения

Название штамма или вакцины	GenBank accession no.
VR-2332	U87392.3
Ingelvac® PRRS MLV	AF066183.4
Ingelvac® PRRS ATP	EF532801.1
HP-PPRS	HZ424618.1

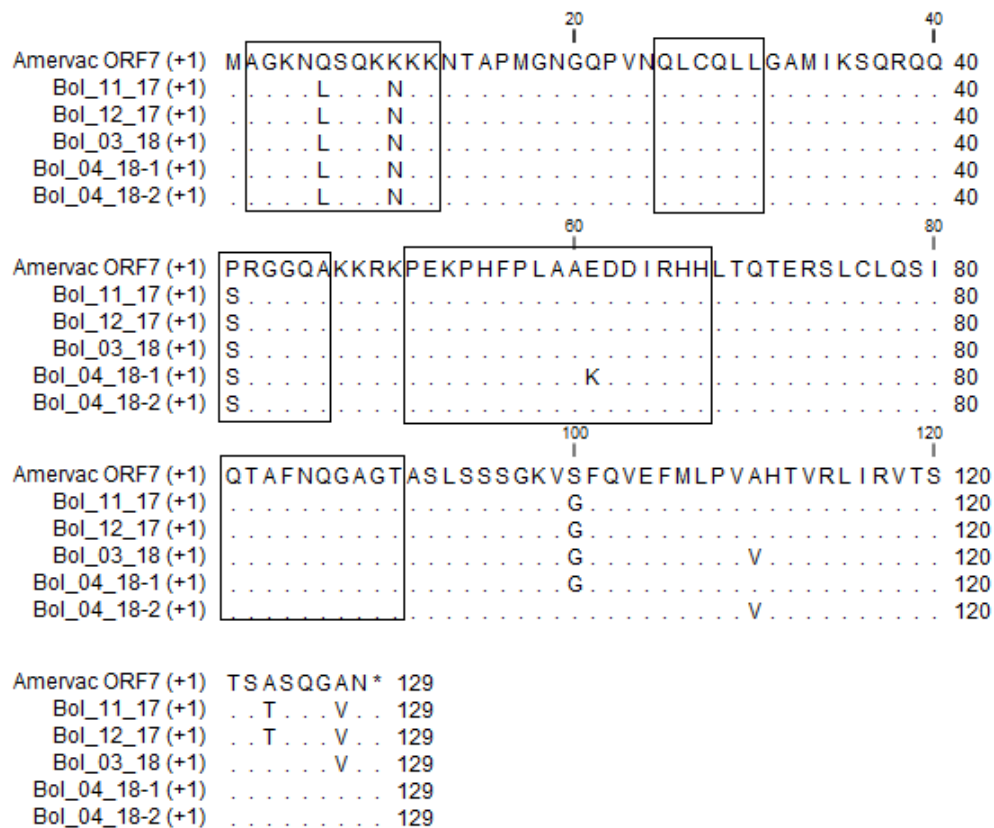


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей ORF7 вируса PPCC 1-го типа (черными рамками отмечены эпитопы)

Выравнивание аминокислотных последовательностей ORF7 вируса PPCC 2-го типа представлено на рисунке 3. Эпитопы ORF7 вируса PPCC 2-го типа имеют аминокислотные замены только в

последовательности аттенуированной вакцины (ATP Ingelvac) и высоко патогенного китайского типа (HP-PRRS).

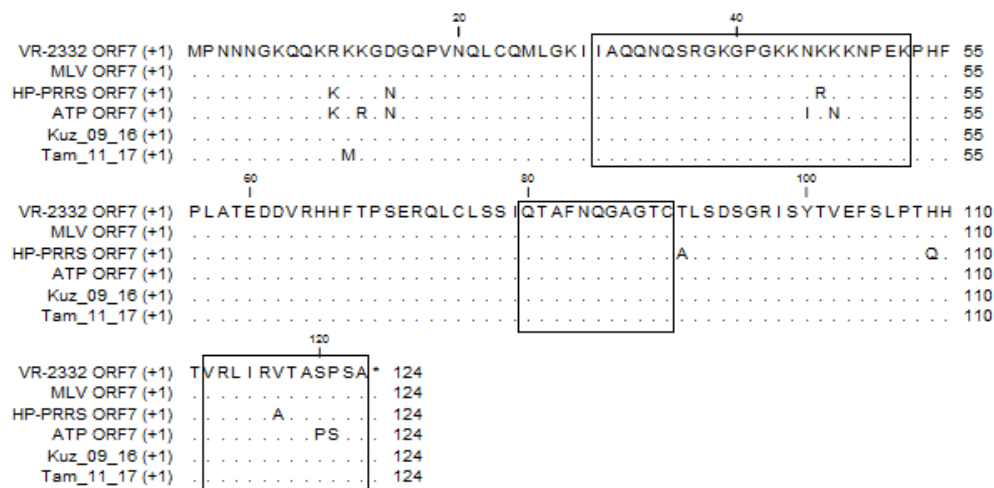


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей ORF7 вируса PPRC 2-го типа. Рамками отмечены эпитопы (aa30-52, aa80-90 и aa112-126). Последовательность вакцины Ingelvac® PRRS MLV условно обозначена в выравнивании как MLV, а вакцины Ingelvac® PRRS ATP – ATP

Заключение

Согласно анализу сиквенсов ORF7 PPRC 1-го типа рассмотренные изоляты принадлежат к подтипу 1 и не проявляют полиморфизм размера гена, замеченный в других подтипах [9].

Изоляты вируса PPRC 2-го типа генетически были наиболее близки к штамму вакцины Ingelvac® PRRS MLV, что согласуется с ранее опубликованными данными [10]. Выравнивание аминокислотных последовательностей ORF7 вируса PPRC 2-го типа показало, что рассмотренные изоляты не имеют аминокислотных замен в сравнении с вакцинным штаммом Ingelvac® PRRS MLV.

Список литературы / References

1. Balka G., Hornyak A., Balint A., Kiss I., Kecskemeti S., Bakonyi T., Rusvai M. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet. Microbiol.*, 2008. 127, 128–135.
2. Dewey C., Charbonneau G., Carman S., Hamel A., Nayar G., Friendship R., Eernisse K., Swenson S. Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Can. Vet. J.*, 2000. 41, 493–494.
3. Faaberg K.S., Balasuriya U.B., Brinton M.A., Gorbalenya A.E., Leung F.C.-C., Nauwynck H., Snijder E.J., Stadejek T., Yang H., Yoo D. Arteriviridae. In: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. Elsevier Academic Press, 2012, San Diego, USA, 796–805.
4. Kapur V., Elam M.R., Pawlovich T.M., Murtaugh M.P. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J. Gen. Virol.*, 1996. 77 (Pt 6), 1271–1276.
5. Keffaber K.K. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1989. 1, 1-10.
6. Kvisgaard L.K., Hjulsgaard C.K., Brar M.S., Leung F.C.C., Larsen L.E. Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years. *Vet. Microbiol.*, 2013. 167, 334–344.
7. Lee C., Kim H., Kang B., Yeom M., Han S., Moon H., Park S., Kim H., Song D., Park B. Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. *Virus Genes*, 2010. 40, 225–230.
8. Meulenber J.J., Hulst M.M., de Meijer E.J., Moonen P.L., den Besten A., de Kluyver E.P., Wensvoort G., Moormann R.J. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993. 192, 62–72.
9. Nieuwenhuis N., Duinhof T.F., van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec*, 2012. 170:225.
10. OIE – Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2017). Chapter 2.8.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.06_PRRS.pdf/ (дата обращения: 25.06.2018).

11. *Rosendal T., Dewey C., Friendship C., Wootton S., Young B., Poljak Z.* Association between the genetic similarity of the open reading frame 5 sequence of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the similarity in clinical signs of Porcine reproductive and respiratory syndrome in Ontario swine herds. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2014. 78, 250–259.
12. *Shi M., Lam T.T., Hon C.C., Hui R.K., Faaberg K.S., Wennblom T., Murtaugh M.P., Stadejek T., Leung F.C.* Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res*, 2010. 154, 7-17.
13. *Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., Potapchuk D.* Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Archives of Virology*, 2008. 153, 1479–1488.
14. *Stadejek T., Stankeviciu, A., Murtaugh M.P., Oleksiewicz M.B.* Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Vet. Microbiol*, 2013. 165, 21–28.
15. *Thanawongnuwech R., Amonsin A., Tatsanakit A., Damrongwatanapokin S.* Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet. Microbiol*, 2004. 101, 9–21.
16. *Wang P.P., Dong J.G., Zhang L.Y., Liang P.S., Liu Y.L., Wang L., Fan F.H., Song C.X.* Sequence and Phylogenetic Analyses of the Nsp2 and ORF5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boars from South China in 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017. 64. 1953–1964.
17. *Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M., ter Laak E.A. Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.*, 1991. 13, 121-130.