

ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА



УДК 616-074:579.841.93

**Ж.К. Кошеметов, В.М. Матвеева, В.М. Строчков,
М.И. Богданова, Н.К. Оразымбетова, Г.Д. Сугирбаева,
С.Ш. Нурабаев, Н.С. Сырым**
Zh.K. Koshemetov, V.M. Matveyeva, V.M. Strochkov,
M.I. Bogdanova, N.K. Orazymbetova, G.D. Sugirbayeva,
S.Sh. Nurabayev, N.S. Syrym

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА

OPTIMIZATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR RABIES DIAGNOSTICS

Ключевые слова: бешенство, штамм, полимеразная цепная реакция, праймер, амплификация, диагностика, специфичность.

В последние годы эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству на территории Республики Казахстан остается неблагоприятной. По данным ветеринарной службы Республики Казахстан ежегодно регистрируется до 350 случаев заболевания бешенством домашних животных. Исходя из этого, разработка новых чувствительных и специфичных экспресс-методов лабораторной диагностики бешенства актуальна для Казахстана. Этим требованиям вполне соответствует метод молекулярной диагностики – ПЦР. ПЦР является эффективным средством инфекционного контроля, поскольку позволяет обнаруживать единичные клетки инфекционных агентов посредством заданного ферментативного увеличения специфичного участка генома микроорганизмов, что делает возможным исследование образцов

разнообразного диагностического материала в короткий промежуток времени (4-6 ч). Одним из важнейших и ответственных этапов при разработке ПЦР является подбор и конструирование специфических праймеров. Подбор праймеров проводили с использованием программы Primer-BLAST. По результатам сравнительного анализа, была выбрана одна пара наиболее специфичных праймеров Rab-f и Rab-r, которая ограничивает участок РНК размером 332 п.н. На основе подобранных праймеров были оптимизированы условия постановки метода ОТ-ПЦР для идентификации вируса бешенства. Примененные олигонуклеотидные праймеры Rab-f и Rab-r показали строгую специфичность к вирусу бешенства в ПЦР, так как не давали перекрестных реакций с гетерологичными и отрицательными контрольными пробами. Далее данный метод был испытан на пригодность и эффективность при исследовании проб патологического материала, взятого от павших, с подозрением на бешенство, животных.

Установлено, что предложенный метод диагностики бешенства методом ОТ-ПЦР является специфичным и позволяет достоверно определять наличие РНК вируса бешенства в биологических пробах без предварительного накопления тестируемого вируса. Метод рекомендуется для экспресс-идентификации данного возбудителя в клинических образцах.

Keywords: rabies, strain, polymerase chain reaction (PCR), primer, amplification, diagnosis, specificity.

Over recent years rabies epidemic and epizootic situation is unfavorable in the Republic of Kazakhstan. According to the data of the veterinary service of Kazakhstan, about 350 rabies cases per year are recorded in domestic animals. That determines the urgency of the development of new sensitive and specific rapid test methods of laboratory rabies diagnosis. A method of molecular diagnosis – polymerase chain reaction (PCR) is one of those. PCR is an effective method which enables detecting single cells of infectious agents by enzymatic increase of the specific genome segment

of microorganisms; that enables studying different diagnostic material samples in short time (4-6 hours). One of the most important stages of PCR development is the selection and construction of specific primers. In the present research the primer selection was performed by the use of Primer-BLAST software. By the comparative analysis one pair of the most specific primers Rab-f and Rab-r which limits a segment of RNA of 332 base pairs was selected. The method of Real Time PCR for rabies virus identification was optimized on the basis of selected primers. The used oligonucleotide primers Rab-f and Rab-r showed a strict specificity to rabies virus in PCR as they did not cross react with heterologous and negative control samples. Further, this method was tested on its applicability and efficiency in testing the samples of pathological material from fallen animals suspected of rabies. It is revealed that the proposed technique of rabies diagnosis by RT-PCR method is specific and enables detecting the presence of rabies virus RNA in biological tests without preliminary accumulation of tested virus; the technique is advisable for rapid identification of this virus in clinical samples.

Кошметов Жумагали Каукарбаевич, к.б.н., зав. лаб. диагностики инфекционных заболеваний, НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. Тел.: +7-72636-7-20-04. E-mail: zhumagali@srai.kz, koshemetov2008@mail.ru.

Матвеева Валентина Михайловна, вед. н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: matveeva-13@list.ru.

Строчков Виталий Михайлович, с.н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Богданова Марина Ивановна, н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: marina_1984@biosafety.kz.

Оразымбетова Нуркуль Калдыбаевна, ст. лаборант, НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Сугирбаева Гульнур Дждолдасбековна, м.н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Нурабаев Сергазы Шуратбаевич, с.н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: sergazy-75@biosafety.kz.

Сырым Назым Сырымкызы, к.в.н., с.н.с., НИИ проблем биологической безопасности, Жамбылская обл., Республика Казахстан. E-mail: nazym-syrym@mail.ru.

Koshemetov Zhumagali Kaukarbayevich, Cand. Bio. Sci., Head, Lab. of Infectious Diseases Diagnosis, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. Ph.: +7-72636-7-20-04. E-mail: zhumagali@srai.kz, koshemetov2008@mail.ru.

Matveeva Valentina Mikhaylovna, Leading Staff Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: matveeva-13@list.ru.

Strochkov Vitaliy Mikhaylovich, Senior Staff Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Bogdanova Marina Ivanovna, Staff Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: marina_1984@biosafety.kz.

Orazymbetova Nurkul Kaldybayevna, Senior Lab. Asst., Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Sugirbayeva Gulnur Dzholdasbekovna, Junior Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: koshemetov2008@mail.ru.

Nurabayev Sergazy Shuratbayevich, Senior Staff Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: sergazy-75@biosafety.kz.

Syrym Nazym Syrymkzy, Cand. Vet. Sci., Senior Staff Scientist, Research Institute of Biological Safety Problems, Jambyl Region, Republic of Kazakhstan. E-mail: nazym-syrym@mail.ru.

Введение

Бешенство встречается во всех странах мира, за исключением островных государств (Великобритания, Япония, Кипр, Австралия и др.), а также ряда государств на севере

(Норвегия, Швеция) и юге Европы (Испания, Португалия) [1, 2].

По данным ветеринарной службы Казахстана, в республике ежегодно регистрируется до 350 случаев заболевания бешенством домаш-

них животных. Ежегодно за медицинской помощью по поводу укусов животными обращаются до 75 тыс. казахстанцев. За последние годы эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству на территории Республики Казахстан остается неблагоприятной. В 2012 г. было зарегистрировано 7 случаев бешенства среди людей (в Южно-Казахстанской области – 5 случаев, Кызыл-Ординской области – 1, в Жамбылской области – 1). За прошедший период 2013 г. зарегистрировано 4 случая бешенства среди людей (в Южно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Актюбинской, Алматинской областях со смертельным исходом) [3]. Диагностика бешенства играет важную роль для оказания своевременной постэкспозиционной лечебной помощи людям и борьбы с бешенством среди животных [4]. Она должна быть быстрой и достоверной, так как это необходимо для оценки риска, который угрожает людям.

Исходя из вышеизложенного, становится очевидной разработка новых методических подходов для лабораторной диагностики бешенства, которые превосходили бы существующие методы по чувствительности, специфичности и скорости выполнения. Таким требованиям наиболее полно соответствует метод молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время использование метода ПЦР является наиболее эффективным средством инфекционного контроля, поскольку позволяет обнаруживать единичные клетки инфекционных агентов посредством заданного ферментативного увеличения специфического участка генома микроорганизмов, что делает возможным исследование образцов различного диагностического материала в короткий промежуток времени (4-6 ч) [5, 6].

Цель данного исследования – оптимизация условий постановки метода ПЦР для диагностики бешенства.

Материалы и методы

В исследовании использовали вирулентный штамм «CVS» вируса бешенства (ВБ).

Выделение РНК из очищенных препаратов вируса проводили с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit фирмы QIAGEN в соответствии с наставлением по применению данного набора.

Поиск нуклеотидных последовательностей ВБ проводили в сети Интернет и на сайте Gene Bank.

Анализ и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета прикладной программы MEGA 6 [7].

Специфические олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения ВБ с

помощью ОТ-ПЦР, подбирали, используя программу «Primer-BLAST» [8].

Важнейшая характеристика праймеров – температура плавления (T_m) отжига, для её расчета использовали упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера: $T_m = [(A+T) \times 2^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4^\circ\text{C}]$.

ПЦР проводили в амплификаторе «Master cycler ep gradient S» фирмы Eppendorf, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок с точностью не менее $0,1^\circ\text{C}$.

Документирование полученных результатов осуществляли при помощи фотографирования гелей в УФ-свете, в геледокументирующей камере XR фирмы BIO-RAD. В качестве маркеров молекулярных масс использовали DNA PCR Marker 1kb фирмы Fermentas.

Результаты и обсуждение

Эффективность метода ПЦР и ее специфичность зависят от многих параметров, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим, специфичность и чувствительность подобранных праймеров. Один из важнейших и ответственных этапов при разработке ПЦР является подбор и конструирование специфических праймеров.

В ходе поиска было отобрано 220 полных геномов ВБ. Выравнивание данных последовательностей и последующий сравнительный анализ проводили с использованием программы MEGA 6 (рис. 1). По данным проведенного анализа было установлено, что процент сходства между различными штаммами ВБ составляет от 75 до 100%. Для некоторых штаммов – всего 60%.

При подборе праймеров учитывали все возможные критерии, влияющие на дальнейшую амплификацию. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, иметь допустимое процентное соотношение GC-оснований – 40-60%, температуру плавления и прогнозируемый размер ПЦР-продукта, находящийся в пределах 130-400 п.н.

Подбор праймеров проводили с использованием программы Primer-BLAST. По результатам сравнительного анализа была выбрана одна пара наиболее специфичных праймеров. Краткая характеристика праймеров представлена в таблице.

В дальнейших исследованиях использовали выбранную пару праймеров Rab-f и Rab-r, которая ограничивает участок РНК размером 332 п.н.

Далее с использованием коммерческого набора фирмы QIAGEN® One Step RT-PCR Kit нами был проведен ряд исследований по определению температуры плавления отжига

подобранных олигонуклеотидных праймеров (рис. 2).

Результаты исследований показали, что наиболее оптимальной температурой плавления отжига для подобранной пары праймеров является 55⁰С.

На основании выбранных в процессе опытов параметров времени и температур для всех стадий амплификации был определен следующий режим проведения ПЦР: 50⁰С – 30 мин.; 95⁰С – 15 мин.; 30 циклов: 94⁰С – 30 с, 55⁰С – 30 с, 72⁰С – 1 мин.; 72⁰С – 10 мин.

После того как были определены оптимальные временные и температурные усло-

вия амплификации, проводили эксперименты по оптимизации содержания компонентов в реакционной смеси. Изменения компонентного состава буфера для реакции вызывают качественное или количественное изменение выхода амплификата.

Одним из важных компонентов буфера является хлорид магния. Концентрация MgCl₂ также влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Однако его избыток может вызывать образование неспецифических продуктов. Оптимальные концентрации подбираются эмпирическим путем в процессе оптимизации условий реакции. Результаты этих исследований представлены на рисунке 3.

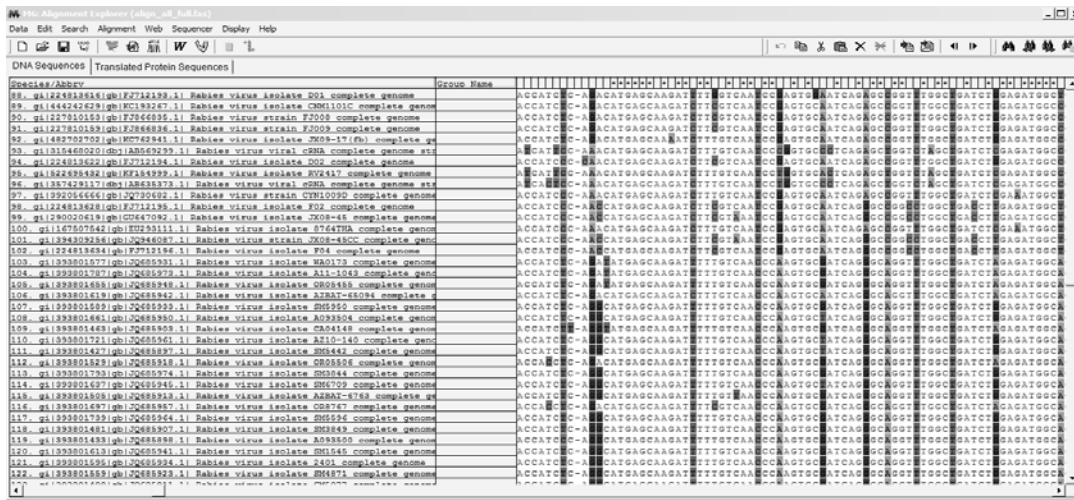


Рис. 1. Сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей ВВ с использованием программы MEGA 6

Таблица

Основная характеристика праймеров

Наименование	Последовательность 3'-5'	Длина, п.н.	Позиция на геноме	Tm, С°	GC%
Rab-f	GGTCACTTCTCAAAGCGGGA	20	4818	59.97	55
Rab-r	TTGGCCAGTCCACAACCTTT	20	5149	60.03	50

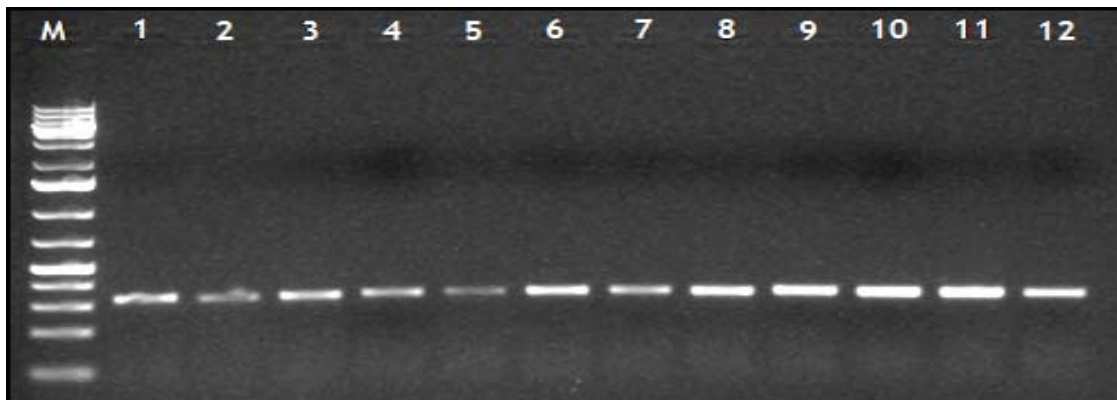


Рис. 2. Подбор температуры плавления отжига подобранных олигонуклеотидных праймеров: М – маркер; 1 – 43,9⁰С; 2 – 44,2⁰С; 3 – 45,2⁰С; 4 – 46,7⁰С; 5 – 48,6⁰С; 6 – 50,7⁰С; 7 – 52,8⁰С; 8 – 55,0⁰С; 9 – 56,9⁰С; 10 – 58,5⁰С; 11 – 59,6⁰С; 12 – 60,1⁰С

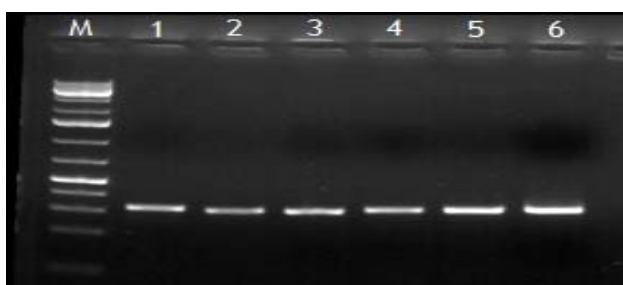


Рис. 3. Оптимизация концентрации $MgCl_2$ в реакционной смеси при обнаружении РНК вируса бешенства методом ПЦР спраймерами Rab-f и Rab-r:
М – маркер ДНК 1kb Fermentas;
1 – 2,5 мМ; **2** – 3,0 мМ; **3** – 3,5 мМ;
4 – 4,0 мМ; **5** – 5,0 мМ; **6** – 6,0 мМ

Из рисунка 3 следует, что изменение концентрации соли в пределах 6,0–2,5 мМ влияет на процесс амплификации при использовании праймеров Rab-f и Rab-r. Выход специфического ПЦР-продукта был обнаружен при концентрации $MgCl_2$, начиная с 2,5 и до 6,0 мМ. На основании полученных опытных данных в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР для приготовления реакционных смесей использовали концентрацию соли 2,5 мМ.

В результате проведенных исследований нами была подобрана оптимальная концентрация реакционной смеси и праймеров для постановки ПЦР следующего состава: (25 мкл) x 5 ПЦР буфер 5 мкл, 1 мкл dNTP (10 мМ), по 1 мкл праймеров (20 пмоль каждый), 1 мкл enzyme, 2 мкл РНК довести до 25 мкл деионизированной водой.

Подобранная пара праймеров была проверена на специфичность обнаружения РНК бешенства. Результаты данных исследований представлены на рисунке 4, откуда следует,

что подобранные олигонуклеотидные праймеры Rab-f и Rab-r показали строгую специфичность к ВБ в ПЦР, так как не давали перекрестных реакций с гетерологичными и отрицательными контрольными пробами.



Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации при определении специфичности праймеров Rab-f и Rab-r:
М – маркер; **1** – РНК вируса чумы плотоядных; **2** – РНК вируса чумы мелких жвачных; **3** – РНК вируса болезни Ауески; **4** – РНК ВБ; **5** – деионизированная вода

В последнее время совершенствование методов лабораторной диагностики бешенства направлено на обнаружение РНК или её фрагментов непосредственно в патматериале от больных или павших животных. Поэтому разработанный нами метод ОТ-ПЦР был испытан на пригодность и эффективность при исследовании проб патологического материала, взятого от павших, с подозрением на бешенство, животных. Параллельно эти же пробы были исследованы в прямом варианте ИФА. Патологический материал был отобран в ходе эпизоотологического мониторинга, проводимого сотрудниками НИИ проблем биологической безопасности Республики Казахстан в Республике Таджикистан. Результаты данных исследований представлены на рисунке 5.

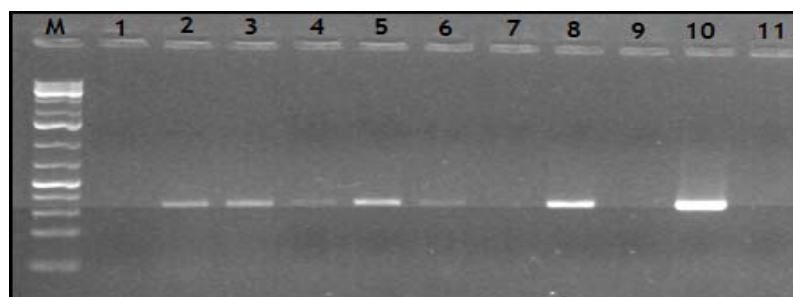


Рис. 5. Исследование в ОТ-ПЦР полевых проб патологического материала с праймерами Rab-f и Rab-r:

М – маркер ДНК 1kb Fermentas; **1** – РНК из пробы мозга сурка (Чиргатальский р-н); **2** – РНК из пробы мозга собаки № 1 (г. Душанбе); **3** – РНК из пробы мозга собаки (Еванский р-н); **4** – РНК из пробы мозга КРС (Раштский р-н); **5** – РНК из пробы мозга собаки № 2 (г. Душанбе); **6** – РНК из пробы мозга КРС № 1 (Файзабадская обл.); **7** – РНК из пробы мозга летучей мыши; **8** – РНК из пробы мозга КРС № 2 (Файзабадская обл.); **9** – РНК из пробы мозга МРС (х-ва Софоров); **10** – позитив контроль; **11** – негатив контроль

На рисунке 5 видно, что из девяти исследованных проб мозга, взятых от павших с подозрением на бешенство животных, в шести была выявлена РНК ВБ. В ИФА положительный результат показали 5 проб из 9, то есть метод ПЦР оказался более чувствительным по сравнению с ИФА.

Таким образом, предложенный метод ОТ-ПЦР для диагностики бешенства является чувствительным и специфичным и позволяет определять наличие РНК ВБ в биологических пробах без предварительного накопления тестируемого вируса.

Заключение

Оптимизирован метод ОТ-ПЦР для экспресс-идентификации ВБ. В результате проведенных исследований установлено, что все положительные пробы были выявлены соответственно подобранным праймерам, Rab-f и Rab-r, вируса бешенства. Подобранные синтетические олигонуклеотидные праймеры для выявления ВБ показали высокую специфичность и пригодны для обнаружения данного возбудителя в клинических образцах, метод пригоден для экспресс-идентификации данного возбудителя.

Библиографический список

1. Шестопалов А.М., Кисурина М.И., Груздев К.Н. Бешенство и его распространение в мире // Вопросы вирусологии. – 2001. – Т. 46. – № 2. – С. 7-12.
2. Cliquet F., Picard-Meyer E. Rabies and rabies-related viruses: a modern perspective on an ancient disease // Rev. Sci. Tech. – 2004. – Vol. 23 (2). – P. 625-642.
3. <http://www.dgsen-almaty.kz/news/> Борьба против бешенства // Дата публикации: 10.09.2013.
4. Недосеков В.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 7-13.
5. Белохвостов А.С. Полимеразная цепная реакция и лигазные реакции, принципы, традиционные методики и нововведения // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1995. – № 2. – С. 21-26.
6. Kattar M.M., Zallouab P.A., Araja G.F., Samaha-Kfourya J., Shbakloe H., Kanjb S.S.,

Khalifea S., Deebc M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2007. – Vol. 59 (1). – P. 23-32.

7. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molecular Biology and Evolution. 2013. – Vol. 30 (12). – P. 2725-2729.

8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

References

1. Shestopalov A.M., Kisurina M.I., Gruzdev K.N. Beshenstvo i ego rasprostranenie v mire // Voprosy virusologii. – 2001. – Т. 46. – № 2. – С. 7-12.
2. Cliquet F., Picard-Meyer E. Rabies and rabies-related viruses: a modern perspective on an ancient disease // Rev. Sci. Tech. – 2004. – Vol. 23 (2). – P. 625-642.
3. <http://www.dgsen-almaty.kz/news/> Bor'ba protiv beshenstva // Data publikatsii: 10.09.2013.
4. Nedosekov V.V. Sravnitel'naya otsenka metodov laboratornoi diagnostiki beshenstva // Veterinarnaya patologiya. – 2002. – № 1. – С. 7-13.
5. Belokhvostov A.S. Polimeraznaya tsep'naya reaktsiya i ligaznye reaktsii, printsipy, traditsionnye metodiki i novovvedeniya // Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. – 1995. – № 2. – С. 21-26.
6. Kattar M.M., Zallouab P.A., Araja G.F., Samaha-Kfourya J., Shbakloe H., Kanjb S.S., Khalifea S., Deebc M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2007. – Vol. 59 (1). – P. 23-32.
7. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molecular Biology and Evolution. 2013. – Vol. 30 (12). – P. 2725-2729.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

