

10. Elenshleger A.A., Khe A.A. Vliyanie probiotika Veles 6.59 na biokhimicheskie pokazateli krovi pri dispepsii novorozhdennykh telyat // Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2012. – № 11 (97). – S. 77-78.



УДК 619:578.835.1 **А.И. Боронбаева, М.К. Исакеев, А.Т. Мамытова, А.Р. Нургазиева**
A.I. Boranbayeva, M.K. Isakeyev, A.T. Mamytova, A.R. Nurgaziyeva

**ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРАЙМЕРОВ
 ДЛЯ ТИПИЗАЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПОВ А, О**

**THE SELECTION AND OPTIMIZATION OF PRIMERS FOR TYPE ASSIGNMENT
 OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS OF TYPES A, O**

Ключевые слова: вирус ящура, праймер, ПЦР, типизация, секвенирование.

Дана краткая характеристика применяемых методов диагностики ящура, наиболее распространенных типов вируса, регистрируемых на территории республики. Изложена методика подбора и оптимизации видоспецифических праймеров, а также результаты эксперимента по типизации вируса ящура с применением ПЦР с обратной транскрипцией. Для проведения ПЦР разработаны праймерами установлены температурный режим отжига праймеров и время денатурации вырабатываемого ими участка. Анализ продуктов амплификации проводили с помощью 2,5%-ного агарозного геля. Для убеждения достоверности полученных результатов проведено секвенирование ПЦР продуктов, полученных с помощью разработанных праймеров. В результате секвенирования установлено – в продуктах амплификации присутствовали РНК вируса ящура типов А и О. Поставленные диагностические реакции на другие типы вируса дали отрицательный результат. Следовательно, подобранные видоспецифические праймеры, характеризующимися высокой специфичностью и чувствительностью, обеспечивали получение достоверных результатов.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, primer, polymerase chain reaction (PCR), type assignment, sequencing.

The existing methods of foot-and-mouth disease (FMD) diagnosis and the most common virus types detected in the Republic are briefly described. The methods of selection and optimization of species-specific primers are presented, and the results of the experiment on the type assignment of FMD virus using reverse transcription PCR are discussed. To run polymerase chain reaction (PCR) by the developed primers, the temperature regime of primer annealing and denaturation time of the site was set. The analysis of amplification products was performed by using 2.5% agarose gel. To confirm the authenticity of the obtained results, sequencing of PCR products obtained by the developed primers was performed. The sequencing revealed that the amplification products contained the RNA of FMD virus of types A and O. Diagnostic reactions to other types of the virus were negative. Consequently, the selected species-specific primers are characterized by high specificity and sensitivity and ensured valid results.

Боронбаева Аида Ильичевна, н.с., лаб. вирусологии и биотехнологии, Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: aida.boronbaeva@gmail.com, aida.boronbaeva@mail.ru.

Исакеев Майрамбек Кыдыралиевич, м.н.с., Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: maku-0711@mail.ru.

Мамытова Айгуль Табалдыевна, к.б.н., с.н.с., лаб. вирусологии и биотехнологии, Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: aigulechka_11@mail.ru.

Boronbayeva Aida Ilyichevna, Staff Scientist, Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: aida.boronbaeva@gmail.com, aida.boronbaeva@mail.ru.

Isakeyev Mayrambek Kydyraliyevich, Junior Staff Scientist, Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: maku-0711@mail.ru.

Mamytova Aigul Tabaldyevna, Cand. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: aigulechka_11@mail.ru.

Нургазиева Асел Рысбековна, к.б.н., с.н.с., лаб. вирусологии и биотехнологии, Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: nurgazieva10@gmail.com.

Nurgaziyeva Asel Rysbekovna, Cand. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: nurgazieva10@gmail.com.

Введение

Животноводство в Кыргызстане является одной из ведущих сельскохозяйственных отраслей, его доля в структуре валовой продукции сельского хозяйства достигает 50%. Успешному развитию этой отрасли способствуют благоприятные природно-климатические условия республики, где 83% сельскохозяйственных угодий, или 9,6 млн га, занимают естественные горные пастбища с богатым травостоем. Наличие природных кормовых ресурсов обеспечивает значительный рост численности сельскохозяйственных животных, в том числе крупного рогатого скота. Вместе с тем, как показывает государственная ветеринарная статистика, по причине достаточно широкого распространения инфекционных болезней, растут потери, недополучения продуктов животноводства, в т. ч. молочной, мясной продукции крупного рогатого скота. Одной из таких эпизоотий, наносящей существенный ущерб скотоводству, является возбудитель ящура. Сложившаяся эпизоотическая ситуация в стране по ящуру является причиной резкого сокращения мясных и молочных продуктов, получаемых от КРС, а также ограничила право экспортировать продукцию в другие государства. Таким образом, был нанесен огромный экономический ущерб скотоводческим хозяйствам и в целом государству. В этих условиях перед ветеринарной наукой и практикой была поставлена задача – усилить контроль и в целом профилактические мероприятия по недопущению эпизоотии ящура, совершенствовать диагностическую и профилактическую работу с этой опасной вирусной инфекцией.

Для контроля эпизоотической ситуации по инфекционным заболеваниям, в том числе по ящуру, важно своевременное проведение профилактических мероприятий. Эффективность проводимых профилактических мероприятий зависит от своевременного и точного определения циркулирующего возбудителя и его типизации. Поэтому нами было поставлена задача – провести типизацию циркулирующего возбудителя ящура на территории республики для эффективного применения профилактических препаратов (вакцин). [1] Для типизации вируса ящура применен молекулярно-биологический метод, то есть полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод является наиболее чувствительным и точным по сравнению с серологическими методами – ИФА, РН, РСК и др.

Возбудителем ящура является РНК-содержащий вирус из семейства пикорнавирусов, размеры вирионов около 20 нм. Вирион вируса ящура, как и других пикорнавирусов, имеет сферическую форму, геном нефрагментирован и заключен в икосаэдрический капсид. По антигенной структуре вирус подразделяется на 7 серотипов – А, О, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2 и САТ-3 [2]. На территории СНГ обычно встречаются вирусы типов А, О и Азия-1 [3]. Животные, переболевшие ящуром одного типа, могут повторно заболеть в случае заражения вирусом другого типа.

Характерными клиническими признаками болезни являются кратковременная лихорадка, афты и эрозии на слизистой оболочке ротовой полости, на кончике венчика и межкопытцевой щели, носового зеркала, вымени. Возможно переболевание животных со стертыми клиническими признаками. У новорожденного молодняка ящур может протекать в сверхострой форме, со смертельным исходом, без образования афт. Ящуром может болеть и человек.

Массовые эпизоотии ящура наносят колоссальный ущерб скотоводческим хозяйствам. Острое течение болезни сопровождается высокой смертностью, а у больных и переболевших животных снижаются удои молока, рост и развитие животных. Расходуются огромные материальные, финансовые средства на проведение мероприятий, направленных на ликвидацию заболевания [4].

Решающую роль в борьбе с ящуром играет своевременное и достоверное диагностирование болезни. Предварительная диагностика основывается на внешних признаках болезни (клинических данных), которые при ящуре довольно характерны (увеличенное слюноотделение, афты в ротовой полости и в области межкопытной щели и на коже вымени). Диагноз уточняется с учетом клинических признаков у животных и по патологоанатомическим данным вскрытия трупов и осмотра внутренних органов.

Для окончательной постановки диагноза и типизации вируса ящура требуется лабораторное диагностирование, которое должно выдать точный и быстрый результат. Обычно лабораторную диагностику проводят серологическими методами (ИФА РСК, РН) и молекулярно-генетическими методами (ПЦР) [5]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и определенные недостатки. В последние годы в лабораторной диагностике

инфекционных заболеваний чаще используется метод ПЦР. Чувствительность и точность метода ПЦР превосходят все другие методы иммунологии при обнаружении возбудителей инфекции [6]. ПЦР способен выявить единичные молекулы возбудителя в исследуемых образцах [7]. Именно эти преимущества (чувствительность, точность и быстрота) при борьбе и контроле эпизоотии по быстро распространяющимся заболеваниям обеспечивают эффективную борьбу с инфекциями. Поэтому в наших исследованиях использован метод ПЦР для определения типов вируса ящура [8].

Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Для подбора видоспецифических праймеров использовали биоинформационную базу данных NCBI (National Center Biotechnological Information, USA). Анализ олигонуклеотидных последовательностей проводили в GenBank с помощью программы BLAST, выравнивания нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Clustal W, выбор параметров праймеров – вручную. В итоге разработан дизайн праймеров (табл. 1). Синтез праймеров осуществляли коммерческой компанией «BioBasic» (Канада). В качестве патологического материала были использованы клинические образцы (носовые смывы и афты), собранные от больных животных во время вспышки ящура в регионах Кыргызской республики в 2006-2012 г.

Выделение РНК вирусов проводили специальным коммерческим набором американского производства Axugen (AxyPrep TMBodyFluid, Viral DNA/RNA miniprepkit, cat. № AP-MN-BF-VNA-250) в соответствии с наставлением по его применению. После выделения РНК проводили обратную транскрипцию коммерческим набором Qiagen (cat. № 205311) по инструкции к применению данного набора.

Для оптимизации температурного режима амплификации использовали амплификатор MiniOpticon (Bio-Rad) с функцией температурного градиента.

Для детекции полученного ПЦР продукта использовали 2,5%-ный агарозный гель на 1x TAE буфере с бромистым этидием. Учет результатов проводили в геледокументирующей системе BIO-RAD GelDoc XR™+imaging system.

Секвенирование полученного ПЦР продукта осуществляли на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Реакцию секвенирования

проводили по методу Сенжера с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

Сборку и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации и построение филогенетических деревьев, анализ соответствия нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью пакет программ MEGA6.

Результаты и их обсуждение

Для достижения специфичности и чувствительности ПЦР необходимо правильно подобрать праймеры, короткие нуклеотидные последовательности от 18 до 25 нуклеотидных оснований, то есть комплементарную часть исследуемого генетического материала. В случае, если выбранный нами участок окажется изменчивым (мутабельным), то наши праймеры окажутся не специфичными, и не будут получены объективные результаты. Поэтому стояла задача – найти более консервативные участки гена вируса ящура для подбора праймеров. Для поиска консервативного участка гена вируса ящура (типов А и О) использовали алгоритм Clustal W, который был включен в пакет программ MEGA6. В дальнейшем собирали как можно больше различных вариантов генома из базы данных GenBank вируса ящура для определения устойчивых мест, подходящих для конструирования праймеров и для проведения типизации вируса ящура с помощью ПЦР. После выравнивания нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Clustal W были получены консервативные участки генов (данный процесс был проведен для каждой из типов в индивидуальном порядке). После получения консервативных участков гена праймеры сконструировали вручную, без использования каких-либо дополнительных программ, но учитывали все требования конструирования праймеров. Причиной ручного выбора праймеров была высокая вариабельность генома вируса ящура. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1
Последовательность полученных праймеров

Название	Последовательности праймеров	Размер ПЦР продукта
FMD-OF	5'-CCACTGTTGAGA ACT ACG GTG G-3'	539 bp.
FMD-O R	5'-CCA AAG AGG CCG GGG GCA GTA-3'	
FMD-A F	5'-TCA GCA GAC CCT GTC ACC ACC-3'	516 bp.
FMD-A R	5'-GCG CAC GAG AAG CTC GTG GA-3'	

Для оптимизации условий ПЦР нами поставлен ряд экспериментов, в ходе которых

установили оптимальный вариант проведения ПЦР с подобранным праймерам. В ходе экспериментов были подобраны температура отжига праймеров, время денатурации и концентрация ионов магния. Для оптимизации условий постановки ПЦР с подобранными праймерами был выбран оптимальный вариант температурного режима амплификации фрагментов генома вируса ящура (табл. 2).

Таблица 2

Температурный режим к амплификации фрагментов генома вируса ящура

Стадии амплификации	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация	94°C	30 с	35-40
Отжиг	55°C	45 с	
Элонгация	72°C	45 с	
Финальная элонгация	72°C	5 мин.	1

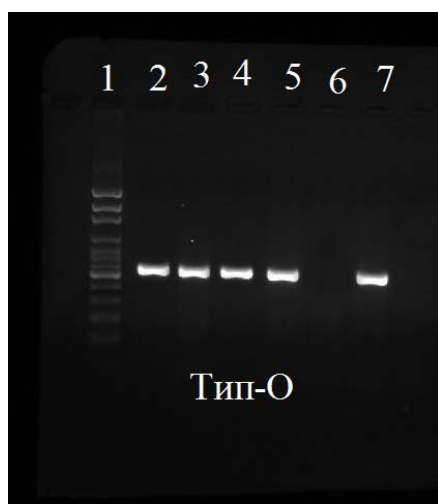
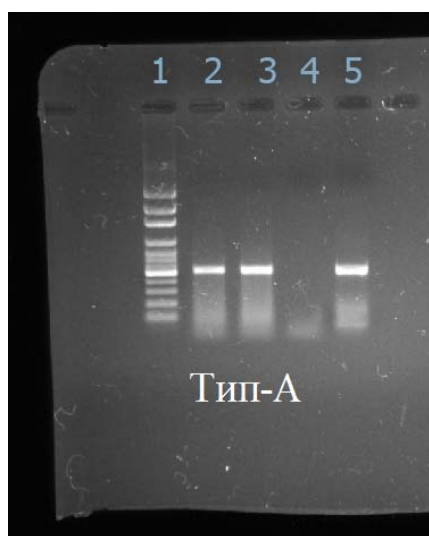


Рис. 1. Результаты полученного ПЦР продукта в агарозном геле:

- тип-А: 1 – маркер; 2, 3 – образцы;
- 4 – отрицательный контроль;
- 5 – положительный контроль;
- тип-О: 1 – маркер; 2 по 5 – образцы;
- 6 – отрицательный контроль;
- 7 – положительный контроль

Анализ продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью 2,5%-ного агарозного геля. Наличие фрагментов ПЦР продукта в геле длиной 519 п.н. и 539 п.н. свидетельствовало о присутствии РНК вируса ящура типов А (516 п.н.) и О (539 п.н.) в исследуемой пробе.

На втором этапе исследований для проверки специфичности реакции с подобранными праймерами наряду с типами А и О возбудителя ящура поставили и на другие типы вируса ящура.

Как показали результаты опытов, с помощью разработанных праймеров нам удалось выявить только типы А и О возбудителя ящура, на другие типы получены отрицательные результаты (табл. 3).

Таблица 3

Специфичность праймеров для выявления возбудителя ящура типов А и О

Типы возбудителя ящура, использованные для контроля	Праймеры для определения типа А возбудителя ящура	Праймеры для определения типа О возбудителя ящура
Тип А	+	-
Тип О	-	+
Тип Азия-1	-	-
Тип С	-	-
Тип Сат-1	-	-
Тип Сат-2	-	-
Тип Сат-3	-	-

Результаты опытов подтверждают специфичность праймеров, разработанных нами, и пригодность их использования в определении циркулирующих типов возбудителя ящура.

В последующих опытах проведено секвенирование полученных ПЦР продуктов для определения точности проводимых амплификаций и обнаружения РНК возбудителя ящура типов А и О. Результаты секвенирования проверяли через BLAST в информационной базе данных NCBI. Кроме того, провели филогенетический анализ для подтверждения специфичности амплифицированных участков. Полученные результаты приведены на рисунке 2.

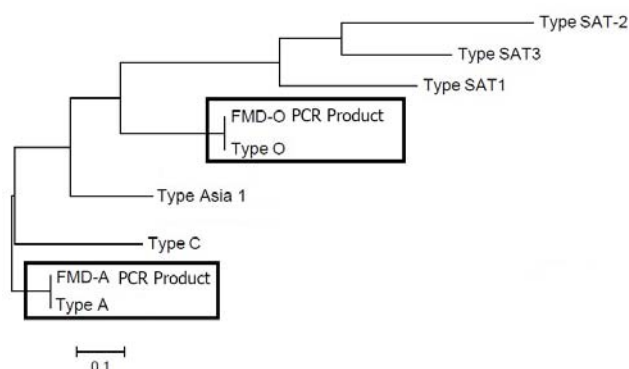


Рис. 2. Филогенетическое дерево полученных ПЦР продуктов

Результаты секвенирования ПЦР продуктов, полученных с помощью разработанных праймеров, также подтверждают достоверность полученных данных. Как видно на рисунке 2, секвенированные ПЦР продукты действительно относятся к геному вируса ящура. Проведенное секвенирование ПЦР продуктов также показывает, что и амплифицированные участки относятся к типам А и О. Это еще раз доказывает специфичность подобранных праймеров и реакции в целом.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования по оптимизации и подбору праймеров для типизации вируса ящура типа А и О показали их пригодность для выявления РНК возбудителя в исследуемых образцах. Данные праймеры характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов. Полученные праймеры можно использовать при диагностировании типов А и О вируса ящура.

Библиографический список

1. OIE (2008). Foot and Mouth Disease. In: OIE Standards Commission (5th Eds.), Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris, France.
2. Бессарабов Б.Ф., Воронин Е.С. Инфекционные болезни животных; под ред. А.А. Сидорчука. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.
3. Hall M.D., Knowles N.J., Wadsworth J., Rambaut A., Woolhouse M.E. Reconstructing geographical movements and host species transitions of foot-and-mouth disease virus serotype SAT 2 // MBio. – 2013. – Vol. 4 (5): e00591-13.
4. Alexandersen S., Klein J., Hussain M., Paton D., Afzal M. Preliminary findings from a new project on the epidemiology of FMDV in Pakistan. European commission for the control of FMD 2006.
5. Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health // J. Vet Microbiol. – 2009. – Vol. 139. – P. 1-23.
6. Reid S.M., Hutchings G.H., Ferris N.P., De Clercq K. Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterisation of viral RNA in clinical

samples // J. Virol. Methods. – 1999. – Vol. 83 (1-2). – P. 113-123.

7. Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., Samuel A.R., Knowles N.J. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89 (1-2). – P. 167-176.

8. Reid S.M., Grierson S.S., Ferris N.P., Hutchings G.H., Alexandersen S. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus // J. Virol. Methods. – 2003. – Vol. 107 (2). – P. 129-139.

References

1. OIE (2008). Foot and Mouth Disease. In: OIE Standards Commission (5th Eds.), Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris, France.
2. Bessarabov B.F., Voronin E.S. Infektsionnye bolezni zhivotnykh; pod red. A.A. Sidorchuka. – M.: KolosS, 2007. – 671 s.
3. Hall M.D., Knowles N.J., Wadsworth J., Rambaut A., Woolhouse M.E. Reconstructing geographical movements and host species transitions of foot-and-mouth disease virus serotype SAT 2 // MBio. – 2013. – Vol. 4 (5): e00591-13.
4. Alexandersen S., Klein J., Hussain M., Paton D., Afzal M. Preliminary findings from a new project on the epidemiology of FMDV in Pakistan. European commission for the control of FMD 2006.
5. Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health // J. Vet Microbiol. – 2009. – Vol. 139. – P. 1-23.
6. Reid S.M., Hutchings G.H., Ferris N.P., De Clercq K. Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterisation of viral RNA in clinical samples // J. Virol. Methods. – 1999. – Vol. 83 (1-2). – P. 113-123.
7. Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., Samuel A.R., Knowles N.J. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89 (1-2). – P. 167-176.
8. Reid S.M., Grierson S.S., Ferris N.P., Hutchings G.H., Alexandersen S. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus // J. Virol. Methods. – 2003. – Vol. 107 (2). – P. 129-139.

