

Удэ и п. Майск Курумканского района Республики Бурятия: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Барнаул, 2005. – 18 с.

3. Барышников П.И., Бондарев А.Ю., Новиков Б.В. Инфекционные болезни диких птиц в лесостепной области Алтайского края // Ветеринария. – 2012. – № 6. – С. 28-31.

4. Белоусова Р.В., Сюрин В.Н. Роль перелетных птиц в распространении вирусов в природе: лекция. – М., 1977. – 53 с.

5. Коровин Р.Н., Зеленский В.П., Грошева Г.А. Лабораторная диагностика болезней птиц: справочник. – М.: Агропромиздат, 1989. – 256 с.

6. Vellegas P. Viral diseases of the respiratory system // Poultry Science. – 1998. – Vol. 77 (8). – R. 1143-1145.

7. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций. – М.: Наука, 1979. – 271 с.

8. Яхонтов А.А. Зоология для учителя. Хордовые / под ред. А.В. Михеева. – М.: Просвещение, 1985. – 256 с.

References

1. Agoltsov V.A. Kandidoz, aspergillez i mukoroz zhivotnykh (diagnostika i mery

bor'by): avtoref. dis. ... d-ra vet. nauk. – N. Novgorod, 2006. – S. 12.

2. Bagryatsova A.L. Mikrobiologicheskiy monitoring sinantropnykh ptits v g. Ulan-Ude i p. Maysk Kurumkansogo rayona Respubliki Buryatiya: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk. – Barnaul, 2005. – 18 s.

3. Baryshnikov P.I., Bondarev A.Yu., Novikov B.V. Infektsionnye bolezni dikikh ptits v lesostepnoy oblasti Altayskogo kraya // Veterinariya. – 2012. – № 6. – S. 28-31.

4. Belousova R.V., Syurin V.N. Rol pereletnykh ptits v rasprostranении virusov v prirode: lektsiya. – M., 1977. – 53 s.

5. Korovin R.N., Zelenskiy V.P., Grosheva G.A. Laboratornaya diagnostika bolezney ptits: spravochnik. – M.: Agropromizdat, 1989. – 256 s.

6. Vellegas P. Viral diseases of the respiratory system // Poultry Science. – 1998. – Vol. 77 (8). – R. 1143-1145.

7. Lvov D.K., Il'ichev V.D. Migratsii ptits i perenos vozbuditeley infektsiy. – M.: Nauka, 1979. – 271 s.

8. Yakhontov A.A. Zoologiya dlya uchitelya. Khordovye / pod red. A.V. Mi-kheeva. – M.: Prosveshchenie, 1985. – 256 s.



УДК 619:578.835.1

А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская
A.I. Boronbayeva, R.Z. Nurgaziyev, Ye.D. Krutskaya

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА О

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION OPTIMIZATION TO DETERMINE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS OF TYPE O

Ключевые слова: вирус ящура, ПЦР, ПЦР в реальном времени, праймер, типизация.

На начальной стадии экспериментов по оптимизации ПЦР в реальном времени исполнителями для каждого типа вируса ящура подбирались и оптимизировались праймеры. Анализировались продукты амплификации ПЦР. Установлено, что в исследованных пробах из двух предполагаемых типов вируса (О, А) присутствовал только тип О. Для усиления специфичности ПЦР в классическом варианте была обработана концепция повышения ее специфичности и проверена экспериментально. Усовершенствованная ПЦР в реальном времени проявила высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость. Сконструированные праймеры рекомендованы для диагностики ящура, вызванного вирусом типов А и О.

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

At the initial stage of the experiments on real-time PCR optimization, the primers for each type of foot-and-mouth disease virus were selected and optimized. PCR amplification products were analyzed. It was found that in the tested samples of two suspected virus types (O, A) the type O only was present. To enhance the specificity of PCR in the classic version, the concept of increasing its specificity was processed and verified experimentally. Improved real-time PCR showed high sensitivity, specificity and reproducibility. The designed primers are recommended for the diagnosis of foot-and-mouth disease caused by virus types A and O.

Боронбаева Аида Ильичевна, 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: aida.boronbaeva@gmail.com, aida.boronbaeva@mail.ru.

Нургазиев Рысбек Зарылдыкович, д.в.н., проф., член-корр. НАН КР, ректор, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: knau-info@mail.ru.

Крутская Екатерина Дмитриевна, к.в.н., доцент, лаб. вирусологии и биотехнологии, Кыргызский НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: katysha_dm@mail.ru.

Boronbayeva Aida Ilyichevna, Leading 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.

Nurgaziyev Rysbek Zaryldykovich, Dr. Vet. Sci., Prof., Corresponding Member of Natl. Acad. of Sci. of Kyrgyz Republic, Rector, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: knau-info@mail.ru.

Krutskaya Yekaterina Dmitriyevna, Cand. Vet. Sci., Assoc. Prof., Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: katysha_dm@mail.ru.

Введение

В последние годы в Кыргызской Республике наряду с ростом численности животных отмечается рост числа неблагополучных ферм по инфекционным болезням. Особенную озабоченность вызывает сохранность молодняка раннего возраста. Определенную роль в возросшей заболеваемости животных играют неудовлетворительные условия ухода, содержания и кормления, а неудовлетворительная профилактика болезней – также недостаток профилактических средств, вакцин, диагностических наборов для поддержания эпидемиологического благополучия. Неудовлетворительное состояние здоровья животных негативно отражается на продуктивности и качестве животноводческой продукции.

Из регистрируемых на территории инфекционных болезней особую обеспокоенность вызывают периодические вспышки ящура новых подтипов, ранее не встречавшихся в Кыргызской Республике.

Основными источниками заноса вируса ящура являются в первую очередь нелегальный завоз и продажа животных, продуктов животноводства и кормов, миграция людей, активное движение автотранспорта [6].

Возбудителем ящура является РНК-содержащий вирус из семейства пикорнавирусов. Вирион вируса ящура, размером вирионов около 20 нм, имеет сферическую форму, геном не фрагментирован 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 [1]. На территории СНГ обычно встречаются вирусы типов А, О и Азия-1. В Кыргызской Республике встречаются все три серотипа ящура (О, А и Азия-1), в последние годы циркулировали типы

О и А. Животные, переболевшие ящуром одного типа, могут повторно заболеть в случае заражения вирусом другого типа.

Характерными клиническими признаками болезни являются кратковременная лихорадка, появление афт и эрозий на слизистой оболочке ротовой полости, на кончике венчика и межкопытцевой щели, носовом зеркальце, вымени. Возможно переболевание животных со стертыми клиническими признаками. У новорожденных телят ящур может протекать в сверхострой форме, со смертельным исходом, без образования афт. Ящуром может болеть и человек [1, 2].

Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева. В качестве патологического материала были использованы клинические образцы (носовые смывы), собранные от больных животных во время вспышки ящура в регионах Кыргызской Республики в 2010-2012 гг.

Выделение РНК вирусов проводили специальным коммерческим набором американского производства Axygen (AxyPrepTM Body Fluid, Viral DNA/RNA miniprep kit, 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.

Метод ПЦР выполнялся в классическом виде и в реальном времени (RT-PCR).

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 XRTM + imagingsystem [3-5].

Результаты и их обсуждение

Для достижения специфичности и чувствительности ПЦР были подобраны оптимальные праймеры, короткие нуклеотидные последовательности от 18 до 25 нуклеотидных оснований, то есть комплементарная часть исследуемого генетического материала. После выравнивания нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Clustal W были получены консервативные участки генов. Данный процесс был проведен для каждого из исследованных типов в индивидуальном порядке. После получения консервативных участков гена праймеры сконструировали вручную, без использования каких-либо дополнитель-

ных программ, но учитывали при этом все требования их построения. Основанием для ручного выбора праймеров была высокая вариабельность генома вируса ящура. Результаты представлены в таблице 1.

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

Анализ продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью 2,5%-ный 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.

Таблица 1

Последовательность полученных праймеров

Название	Последовательности праймеров	Размер ПЦР продукта
FMD-OF	5'-CCACTGTTGAGAACTACGGTGG -3'	539 bp.
FMD-OR	5'-CCAAAGAGGCCG 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'	

Таблица 2

Температурный режим амплификации фрагментов генома вируса ящура

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

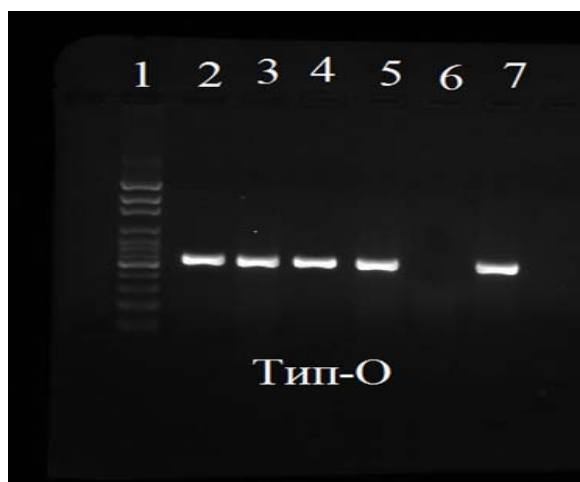


Рис. 1. Характеристика ПЦР продукта в классическом варианте:
 1 – маркер; 2-5 – образцы; 6 – отрицательный контроль; 7 – положительный контроль

Как показали результаты экспериментов, с помощью разработанных праймеров нам удалось выявить только тип О возбудителя ящура, на другие типы получены отрицательные результаты.

На втором этапе исследований для проверки специфичности реакции с подобранными праймерами мы провели ПЦР в реальном времени.

Одним из самых современных и экспрессивных вариантов ПЦР является ПЦР в реальном времени. Название отражает общий смысл новой модификации. ПЦР в реальном времени основан на количественной детекции флуоресцентного сигнала, который увеличивается пропорционально количеству ПЦР-продукта. Результат постановки ПЦР в реальном времени можно регистрировать в процессе реакции, в каждый момент времени. Исторически существуют два метода флуоресцентного определения количества ампликонов: использование химических агентов, неспецифически связывающихся с ДНК; использование флуоресцентных зондов (TagMan зонды и молекулярные маяки (Molecularbeacons), или их называют молекулярными скорпионами (Molecularscorpions). При этом неспецифические красители связываются с двойной спиралью ДНК и не связываются с односпиральными молекулами. Наиболее известным и широко используемым является краситель SibrGreen.

Ввиду того, что разрабатываемую ПЦР планировали использовать в режиме реального времени с красителем SibrGreen, необходимо было минимизировать образование неспецифических фрагментов, возникающих при постановке ПЦР, с пробами патологического материала. В результате была предложена концепция повышения специфичности реакции путем введения ряда условий, ограничивающих неспецифические реакции с использованием предельных температур, обеспечивающих синтез специфического ампликона, т.е. температуры денатурации, отжига и элонгации.

Проведение ПЦР в режиме реального времени с градиентом температуры от 80 до 95°C показало выраженную зависимость предельно высокой температуры денатурации от размера ампликона. Так, для ам-

пликона размером 539 п.н. синтез блокировался при температуре денатурации 86°C. При более высоких температурах синтезировались неспецифические фрагменты, хотя Ct для длинных фрагментов возрастало (табл. 3).

Таблица 3

Параметры синтеза ПЦР продуктов при различных температурах денатурации

Температура денатурации	C (t)
95,0	30,62
94,1	28,92
92,1	27,47
89,4	20,71
86,0	14,64
83,2	20,03
81,2	20,07
80,0	19,96

Аналогичный подход был использован для подбора оптимальной температуры элонгации. Таким образом, был подобран следующий температурный режим ПЦР реакции в реальном времени.

Таблица 4

Температурный режим к амплификации фрагментов генома вируса ящура типа О в ПЦР RT

Стадии амплификации	Температура, °C	Время	Количество циклов
Удержание	95	1 мин.	35
Денатурация	94	15 с	
Отжиг	60	20 с	
Элонгация	72	15 с	

Далее со всеми исследуемыми пробами провели ПЦР в реальном времени (рис. 2).

Проведенные исследования по оптимизации и подбору праймеров для типизации вируса ящура типов А и О показали их пригодность для выявления РНК возбудителя в исследуемых образцах. В нашем патологическом материале был выделен тип О вируса ящура. Сконструированные праймеры проявили высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов. Полученные праймеры можно использовать при диагностировании типов А и О вируса ящура. Также был подобран оптимальный температурный режим параметров ПЦР в реальном времени с красителем SibrGreen.

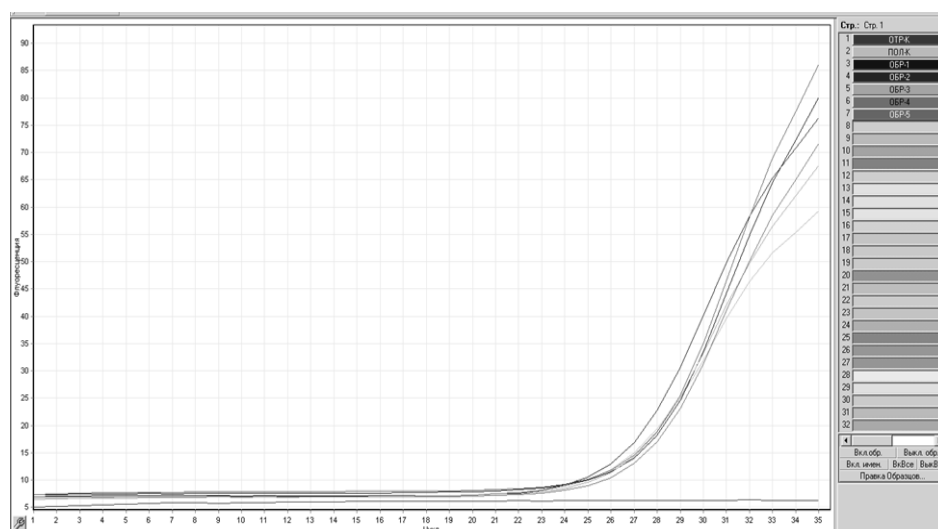


Рис. 2. Характеристика полученного ПЦР продукта в реальном времени:
 1 – отрицательный контроль; 2 – положительный контроль; 3-7 – исследуемые образцы

Библиографический список

1. Бессарабов Б.Ф., Воронин Е.С. Инфекционные болезни животных / под ред. А.А. Сидорчука. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.
2. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
3. Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., Mertens P., 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 // Vet. Microbiol. – 2009. – Vol. 139 (1-2). – P. 1-23.
4. 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.
5. 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.
6. Обострение эпизоотической ситуации по ящуру в Азии / В.М. Авилов, Т.З. Байбиков, В.Н. Герасимов и др. // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. к 75-летию со дня рождения И.А. Бакулова. – Покров, 2000. – С. 47-49.

Reference

1. Bessarabov B.F., Voronin E.S. Infektsionnye bolezni zhivotnykh / pod red. A.A. Sidorchuka. – M.: KolosS, 2007. – 671 s.
2. Syurin V.N., Belousova R.V., Fomina N.V. Diagnostika virusnykh bolezney zhivotnykh. – M.: Agropromizdat, 1991. – 528 s.
3. Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., Mertens P., 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 // Vet. Microbiol. – 2009. – Vol. 139 (1-2). – P. 1-23.
4. 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.
5. 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.
6. Obostrenie epizooticheskoy situatsii po yashchuru v Azii / V.M. Avilov, T.Z. Baybikov, V.N. Gerasimov i dr. // Diagnostika, profilaktika i mery borby s osobo opasnymi, ekzoticheskimi i zooantropoznymi boleznyami zhivotnykh: sb. statey mezhdunar. nauchno-prakt. konf. k 75-letiyu so dnya rozhdeniya I.A. Bakulova. – Pokrov, 2000. – S. 47-49.

