

ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

Исакеев М.К., Акматова Э.К., Крутская Е.Д., Мамытова А.Т.

Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии имени А.Душшеева
Бишкек, Кыргызская Республика

Резюме. Получены индивидуальные праймеры и адаптирована программа работы ПЦР-диагностики чумы плотоядных. Методом полимеразной цепной реакции исследованы образцы, полученные от больных животных. Изучена возможность выявления РНК вируса чумы плотоядных с помощью полимеразной цепной реакции полученными праймерами с обратной транскрипцией и оптимизирована методика постановки. Показано, что подобранные праймеры характеризуется высокой чувствительностью и достоверностью.

Ключевые слова: чума плотоядных, полимеразная цепная реакция, оптимизация праймеров.

ЭТ МЕНЕН ТОЮТТАНУУЧУ ЖАНЫБАРЛАРДЫН КЫРГЫНЫН АНЫКТОО ҮЧҮН ПРАЙМЕРЛЕРДИ ОПТИМИЗАЦИЯЛОО ЖАНА ТАНДОО

Исакеев М.К., Акматова Э.К., Крутская Е.Д., Мамытова А.Т.

А. Душшеев атындагы Кыргыз ветеринария илимий-изилдөө институту
Бишкек, Кыргыз Республикасы

Корутунду. Эт менен тоюттануучу жаныбарлардын кыргынынын аныктоо үчүн индивидуалдык праймерлер алынган жана полимераздык чынжырлуу реакция диагностикасынын программасы адаптацияланган. Полимераздык чынжырлуу реакциясы методу менен орулуу жаныбарлардан алынган патологиялык материалдар изилденген. Кайра транскрипциялануучу праймерлер менен полимераздык чынжырлуу реакциясы аркылуу эт менен тоюттануучу жаныбарлардын кыргынынын РНКсын табуусун изилденген жана коюу методикасы оптимизацияланган. Ылганган праймерлердин жогору сезгичтигин жана шексиздигин характеристикасы көрсөтүлгөн.

Негизги сөздөр: эт менен тоюттануучу жырткычтардын кыргыны, полимераздык чынжырлуу реакция, праймерлерди оптимизациялоо.

SELECTION AND OPTIMIZATION OF PRIMERS FOR CANINE DISTEMPER DETECTION

Isakeev M.K., Akmatova E.K., Krutskaya E.D., Mamytova A.T.

Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named by A. Duysheeva
Bishkek, Kyrgyz Republic

Resume. Received individual primers and adapted work program for PCR diagnosis of canine distemper. Polymerase chain reaction investigated samples obtained from diseased animals. The possibility of detection of canine distemper virus RNA by polymerase chain reaction with primers derived from the reverse transcription and optimized method of production. It is shown that the selected primers characterized by high sensitivity and reliability.

Key words: canine distemper virus, polymerase chain reaction, optimization of primers.

Актуальность.

Собаки среди домашних животных являются единственным видом, чьи биологические способности позволяют использовать их в различных отраслях. Вместе с тем широкое использование собак в различных целях, в том числе в быту приводит к увеличению их численности, возрастает угроза распространения различных инфекционных болезней.

Одной из наиболее распространенных болезней является чума плотоядных, уровень смертности от этой инфекции достигает 70–80% [1]. Эпизоотические наблюдения показывают, что клиническая картина болезни со временем изменяется и утрачивает свою типичность. Ни одна другая болезнь не имеет такого огромного количества ошибочных диагнозов, как чума плотоядных. Этой болезни свойственны полиморфизм клинических и патологоанатомических синдромов, отсутствие четко выраженных клинических признаков, сложные особенности взаимоотношений специфического возбудителя, вторичной микрофлоры и макроорганизма, разнообразие инфекционного, и эпизоотического процесса.

Все эти сложно диагностируемые клинические симптомы указывают на необходимость лабораторного диагностирования, которое должно выдать точный и быстрый результат. Одним из таких методов лабораторной диагностики чумы плотоядных является полимеразная цепная реакция

(ПЦР).

Серологические методы диагностики, как ИФА, РН, РДП, РСК, РНГА часто дают сомнительные результаты, что вызывает необходимость постановки повторной диагностики, занимая много времени. Для достоверного и своевременного обнаружения возбудителя чумы плотоядных необходимо использовать современные методы диагностики.

В настоящее время в ветеринарии для дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний успешно используются методы молекулярной биологии, в том числе и ПЦР. Чувствительность и точность данного метода превосходит все другие методы иммунологии при обнаружении возбудителей инфекции. ПЦР способна выявить возбудителя на самых ранних стадиях болезни, даже до появления выраженных клинических признаков болезни. С помощью ПЦР можно обнаружить единичные молекулы возбудителя в исследуемых образцах.

В наших экспериментах для выявления возбудителя чумы плотоядных применена ПЦР. В задачу исследований входила оптимизация праймеров к ПЦР, которые можно использовать в научных исследованиях, а также в практической ветеринарии при диагностировании чумы плотоядных.

Чума плотоядных (ЧП) – высококонтагиозная

вирусная болезнь, характеризуется признаками лихорадки, гнойного ринита, конъюнктивита, пневмонии, гастроэнтерита, поражает центральную нервную систему. Протекает в острой и подострой форме. К чуме плотоядных восприимчивы собаки, волки, лисицы, шакалы, песцы, хорьки, соболи и другие виды плотоядных животных [2, 4].

Возбудитель чумы плотоядных РНК-содержащий вирус, имеющий на поверхности два белка-антигена Н и F, относится к роду морбилливирусов. К этой же группе относится вирус кори человека, чумы крупного рогатого скота, чумы мелких жвачных и возбудители ряда других инфекционных болезней [2, 6].

Согласно принятой классификации возбудитель чумы плотоядных относится к семейству парамиксовирусов, которое включает три рода: параинфлюэнца, морбилли и пневмовирусы (parainfluenza, morbilli, pneumoviridae) [3, 5]. Вирионы имеют разнообразную форму, от сферической до нитевидной с диаметром от 100 до 700 нм. Внутри он содержит нуклеокапсид со спиральной структурой [6].

Целью работы является подбор и оптимизация праймеров для выявления чумы плотоядных с помощью молекулярно-генетического метода.

Материалы и методы исследований.

Для подбора видоспецифических праймеров использовали биоинформационную базу данных NCBI (National Center Biotechnological Information, USA). Анализ олигонуклеотидных последовательностей осуществляли в GenBank с помощью программы BLAST. Выбор параметров праймеров проводили с помощью программы Primer 3. В итоге разработан дизайн праймеров, как видно из таблицы 1. Синтез праймеров осуществляли коммерческой компанией «BioBasic» (Канада). Для эксперимента были собраны клинические образцы от больных животных (соскобы, сыворотка крови, смывы и др.). Для оптимизации условий постановки ПЦР использовали выделенный РНК из референсного штамма вируса чумы плотоядных «Onderstepoort». Для контроля специфичности праймеров использовали возбудителей

парамиксовирусов: парагриппа собак, чумы мелких жвачных, болезнь Ньюкасла.

Выделение РНК вирусов проводили специальным коммерческим набором американского производства Axygen (AxyPrep™ Body Fluid, 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 Mini Opticon (Bio-Rad) с функцией температурного градиента.

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

Результаты и их обсуждение.

На основе данных нуклеотидных последовательностей генома чумы плотоядных были получены специфические праймеры к гену матрикс (М).

Ген М отвечает за синтез матрикс белка, расположенного на внутренней поверхности оболочки вируса [7]. Он играет ключевую роль в вирусном морфогенезе, сохраняя стабильность мембраны. Кроме этого он более консервативен относительно других генов (табл. 1).

Для проведения ПЦР с подобранными праймерами использованы следующие компоненты реактивов с расчетом объема реакционной смеси 20 мкл:

- 7,2 мкл деионизированная вода
- 4 мкл 5x буфера
- 0,4 мкл 10x dNTPmix
- 1,2 мкл 25 mM MgCl₂
- 2 мкл 0,5 μM праймера CDV-M1
- 2 мкл 0,5 μM праймера CDV-M2
- 0,2 мкл Taq ДНК полимеразы
- 3 мкл кДНК 25 нг/мкл

Таблица 1.
Последовательность праймеров

| Праймеры | Олигонуклеотидная последовательность | Размер ПЦР продукта п.н. |
|----------|--------------------------------------|--------------------------|
| CDV-M1 | 5' – GGC TCA TAC CCC AAG TCA GA – 3' | 681 п.н. |
| CDV-M2 | 5' – TCG TTC CTC CTA TCC CTC CT – 3' | |

Таблица 2.
Специфичность праймеров при диагностике чумы плотоядных

| № проб | Возбудители | Результат |
|--------|---|-----------|
| 1 | Образец, выделенный от больного животного | + |
| 2 | Референтный штамм чумы плотоядных | + |
| 3 | Парагрипп собак | – |
| 4 | Чума мелких жвачных | – |
| 5 | Болезнь Ньюкасла | – |
| 6 | Чистый отрицательный контроль | – |



Рис. 1. ПЦР–продукт 681 пар нуклеотидов, полученных при отжиге праймеров при температуре 55°С, 1 – маркер, 2-4 – пробы, 5 – отрицательный контроль, 6 – положительный контроль

В ходе эксперимента была отобрана оптимальная температура отжига праймеров. Амплификацию проводили при температуре 53°С, 54°С, 55°С, 56°С, 57°С. Были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации, которые показали, что оптимальной температурой отжига праймеров является 55°С (рис. 1).

На втором этапе исследований для проверки специфичности реакции с подобранным праймером, кроме штамма вируса чумы плотоядных, в качестве отрицательного контроля испытаны другие представители семейства парамиксовирусов.

Как показали результаты опытов, с помощью метода ПЦР нам удалось выявить специфический фрагмент гена М чумы плотоядных (рис. 1). Данный специфический фрагмент не выявлен в отрицательных контролях (табл. 2). Это еще раз подтверждает специфичность подобранных праймеров и ПЦР анализа в выявлении возбудителя чумы плотоядных.

В результате проведенных опытов положительные результаты получены только в двух случаях (пробы 1 и 2). В пробах 3, 4, 5, которые использовались в качестве отрицательного контроля, получили ожидаемые отрицательные результаты. Данные результаты подтверждают специфичность праймеров, разработанных нами, и пригодность их использования в диагностических и научно-исследовательских целях.

Заключение.

Оптимизированные нами праймеры для идентификации возбудителя чумы плотоядных характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов.

Это исключает получение сомнительных результатов в отличие от серологических методов диагностики (ИФА, РН, РДП, РСК, РНГА). Высокая специфичность разработанных праймеров позволяет установить диагноз у заболевших животных, при различных стадиях болезни. Широкое их применение позволит успешно решать задачи, связанные с диагностированием и дифференциацией чумы плотоядных от других клинически схожих заболеваний, что, следовательно, позволит более целенаправленно контролировать эпидемиологическую ситуацию по чуме плотоядных животных в республике.

Литература:

1. Груздев К.Н., Селиванов А.В. Чума плотоядных. -М., 1996. - С. 15–21.
2. Appel M., Sheffy B.E., Percy, D.H. & Gaskin, J.M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs / *American Journal of Veterinary Research* -1974. №35. P.803-806.
3. Barrett T., Subbarao S., Belsham C.J et al. *The Paramyxoviruses* / Dlenum Press. - New York. - 1991. - P.83–102.
4. Evermann, J.F., Leathers, C.W., Gorham et al *Pathogenesis of two strains of lion (Pantheraleo) morbillivirus in ferrets (Mustellaputoriusfuro)* / *Veterinary Pathology*. – 2001. – P.138, 311 -316.
5. Griffin, D.E. *Measles virus* / In *Fields Virology, 4th edn. Edited by Knipe D.M., Philadelphia P.A: Lippincott Williams and Wilkins*. – 2001. - P.1401-1441.
6. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert, M.J. / *Veterinary Virology*. - San Diego, Calif: Academic Press. -1999.
7. Peeples, M.E. *Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road* / In *The Paramyxoviruses. Edited by Kingsbury D. New York: Plenum Press*. – 1991. - P.427-456.