

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Акматова Э.К., Камарли А.А., Акматбекова Г.Ж., Джээнбаева С.А.

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

Резюме. Разработка в последнее время новых подходов к индикации и идентификации микроорганизмов связано с достижениями в области молекулярной генетики. Цель работы - разработать и апробировать тест-систему для количественного определения ДНК возбудителя парвовирусного энтерита собак с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработаны генноспецифические пары праймеров для выявления серотипов парвовирусного энтерита у собак. В результате проведенных работ были оптимизированы условия отжига праймеров для обнаружения CPV (2a, 2b, 2c) с помощью ПЦР-диагностики.

Ключевые слова: парвовирусный энтерит собак, ПЦР, оптимизация и апробация тест-системы, праймеры.

ИТТИН ПАРВОВИРУСУК ЭНТЕРИТ ЫЛАНЫНЫН ЧЫНЖЫРЧА ПОЛИМЕРАЗА РЕАКЦИЯСЫ (ЧПР) МЕНЕН АНЫКТОО ЫКМАЛАРЫН ИШТЕП ЧЫГУУ ЖАНА АПРОБАЦИЯЛОО

Акматова Э.К., Камарли А.А., Акматбекова Г.Ж., Джээнбаева С.А.

А. Дуйшеев агындагы Кыргыз ветеринария илимий-изилдөө институту
Бишкек, Кыргыз Республикасы

Корутунду. Микроорганизмдерди индикациялоодо жана идентификациялоодо жаңы жолдорду иштеп чыгуунун себеби, молекулярдык генетика илиминин өнүгүп өсүшү менен байланыштуу. ЧПР ыкмасынын жардамы менен иттердин парвовирустук энтерит ылананын ДНК козгогучун сандык аныктоочу тест-системаны иштеп чыгуу жана апробациялоо. Иттердин парвовирустук энтерит ылананын вирусунун серотиптерин аныктоо үчүн генноспецификалык праймерлердин жубу иштелип чыкты. Жүргүзүлгөн иштердин натыйжасында CPV (2a, 2b, 2c) вирустарын ЧПР диагностикасынын жардамы менен табууда праймерлердин катыруу (отжиг) шарттары оптималдаштырылды.

Негизги сөздөр: иттердин парвовирус энтерити, ЧПР, оптималдаштыруу жана тест-системаны апробациялоо, праймерлер.

DEVELOPMENT AND APPROBATION OF A TECHNIQUE OF REVEALING PARVOVIRAL ENTERITIS USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Akmatova E.K., Kamarli A.A., Akmatbekova G.J., Djeenbaeva S.A.

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

Resume. Development recently new approaches for indicating and identification of microorganisms associated with advances in of molecular genetics. Develop and approbation a test system for quantitative determination of the DNA of the pathogen parvovirus enteritis by polymerase chain reaction (PCR). Designed primer pairs for detecting serotypes parvovirus enteritis in dogs. The result of the work conditions have been optimized for the detection of primer annealing CPV (2a, 2b, 2c) by PCR diagnostics.

Key words: parvovirus enteritis of dogs, PCR, optimization and approbation of test systems, primers.

Актуальность.

Парвовирусный (геморрагический) энтерит собак (лат. – Parvovirus enteritis canum; англ. – Minute virus infection of dogs, вирусный энтерит собак, «олимпийка») – остро протекающая высококонтагиозная вирусная болезнь собак, характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим воспалением желудочно-кишечного тракта, миокардитом, лейкопенией, дегидратацией и гибелью щенков моложе 5-месячного возраста [1, 2].

У представителей семейства собачьих выделено 2 типа парвовируса собак: CPV-1 и CPV-2. Вирус CPV-1 не патогенен для собак, тогда как второй тип вируса восприимчив к этому виду и вызывает вирусный энтерит. Исходный вирус CPV-2, в дальнейшем был заменен среди популяций собак серотипами, несущими небольшие антигенные варианты CPV-2a, 2b и 2c [3, 4, 5].

Вирионы парвовирусов представляют собой мелкие, безоболочечные, икосаэдрической формы, диаметр которых варьирует от 17 до 28 нм, состоящие из 32 капсомеров диаметром 2-4 нм. Плавающая плотность в хлориде цезия (CsCl) составляет 1,38-1,45 г/см³. Геном парвовирусов представлен односпиральной ДНК размером 1,4-1,7х10⁶ кД [6].

Несмотря на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий, парвовирусный энтерит собак продолжает наносить собаководству многих стран мира значительный экономический ущерб, который складывается из снижения продуктивности, проблем воспроизводства и преждевременной выбраковки служебных и декоративных пород собак, а также затрат на проведение диагностических исследований [7]. В связи с этим необходимо разработать тест-систему, которая может идентифицировать инфекцию в начальных стадиях заражения. Для достижения быстрой и своевременной диагностики этого заболевания недостаточно использовать традиционные методы диагностики (серологические методы), необходимо применять более современные методы, такие как молекулярно-генетические методы исследования (ПЦР).

Данный метод позволяет обнаружить идентичные молекулы возбудителя в биопробах, на основании выявления специфичных для них участков генома [8, 9, 10].

Цель исследования: разработать и апробировать тест-систему для количественного определения ДНК возбудителя парвовирусного энтерита собак с помощью

молекулярно-генетического метода ПЦР.

Материалы и методы исследования.

На основе анализа генетических последовательностей ДНК, полученные из базы данных GenBank, были выбраны пара праймеров для амплификации фрагмента генома возбудителя CPV. В качестве положительного контроля использовали вакцинный штамм 154. Апробация тест-системы была проведена на 12 образцах полученные от больных животных. Выделение ДНК проводили с использованием набора Axugen (США) в соответствии с наставлением по его применению. Анализ олигонуклеотидных последовательностей осуществляли в GenBank с помощью программы BLAST. Выбор параметров праймеров проводили с помощью программы Primer 3. Специфические праймеры были разработаны лабораторией болезней домашних животных КНИИВ имени А. Дуйшеева (табл.1). Синтез праймеров осуществляли коммерческим набором компании «Bio Basic» (Канада).

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 гель документирующей системе BIO-RAD Gel Doc XRTM+ imaging system.

Результаты и обсуждение.

Впервые получен праймер и адаптирована программа его работы для ПЦР-диагностики по всем трем серотипам CPV (2a, 2b, 2c). Компоненты ПЦР для наших исследований мы использовали реактивы российского производства AmpliSens. Соотношение реактивов показаны ниже в таблице 2.

Амплификацию проводили на термоциклере Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Параметры температурного режима показаны в таблице 3.

В ходе эксперимента была отобрана оптимальная температура отжига праймеров. Амплификацию проводили при температуре 51°C, 52°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C. Были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации, которые показали, что оптимальной температурой отжига праймеров является 58°C.

Нами было проведено исследование биологических и патологических материалов методом ПЦР на парвовирусный энтерит собак. Результаты приведены на рисунке 1.

Заключение.

Разработан ПЦР метод для количественного определения ДНК возбудителя парвовирусного энтерита собак. Разработанная тест-система позволяет сократить время исследований по сравнению с традиционными методами выявления возбудителя CPV. Подобранные

Таблица 1.
Последовательность праймеров CPV

Праймеры	Олигонуклеотидная последовательность	Размер ПЦР продукта п.н.
CPV-VP1	5' – GAG TGA TGG AGC AGT TCA ACC – 3'	1059 п.н.
CPV-VP2	5' – CGC TCC CCC CCG TCC TGC T – 3'	

Таблица 2.
Состав реакционной смеси на 1 пробу

ddH ₂ O	5x ПЦР буфер	MgCl ₂ 25mM	dNTP 10mM	Праймеры		Taq пол 5 U/мкл	ДНК
				CPV-VP1	CPV-VP2		
10,9	4	0,5	0,4	1	1	0,2	2

Таблица 3.
Температурные режимы для проведения амплификации

Начальная денатурация	94°C	2 минуты	1 стадия
Денатурация	94°C	40 секунд	36 стадий
Отжиг праймеров	58°C	45 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Окончательная элонгация	72°C	5 минут	1 стадия

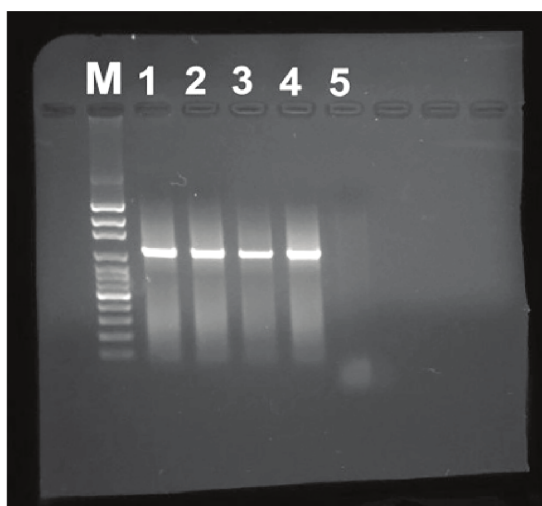


Рис. 1. ПЦР продукт 1059 пар нуклеотидов. М-маркер, 1-4-пробы, 5-отрицательный контроль

праймеры применимы для ПЦР-исследований и могут быть использованы для создания диагностических систем в будущем. Оптимизированные нами праймеры для идентификации возбудителя парвовирусного энтерита собак характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов.

Литература:

1. Touratier L. A., *propos d'une epizootie canine de gastro-enterite a parvovirus* // Bull. Acad. Veter. -1979. -Vol. 52, №4. - P.605-609.
2. Ejimi H., Aimi K., Tagawa M. *Leukocyte transfusion to puppies with canine parvovirus infection* // Bull. Nippon Veter. Zootechn. Coll. Tokyo. - 1980. -Vol. 332. №5. - P.103-107.
3. Parrish CR, O'Connell PH., Evermann JF. *et al. Natural variation of canine parvovirus.* Science. - 1985. 230:1046-1048.
4. Parrish CR., Have P., Foreyt WJ. *et al. The global spread*

and replacement of canine parvovirus strains. J Gen Virol. - 1988; 69 (Pt 5):1111-1116.

5. Parrish CR., Aquadro CF., Strassheim ML. *et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus.* J Virol. - 1991; 65:6544-6552.
6. Parrish, C. R., C. F. Aquadro, and L. E. Carmichael. *Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses.* Virology. - 1988. 166: 293-307.
7. Hasonova L., Pavlik J. *Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review.* Veterinarni Medicina. - 2006. - P.193-211.
8. Fluit A.D. Visser M.R., Schmitz F-J. // Clin.Microbiol. Rev. - 2001. - Vol. 14. - P. 836-871.
9. Gurtler V., Stanisich V.A. // Microbiology. - 1996. -Vol. 142. - P. 3-16.
10. Mullis K., Falona F., Powledge T.M. *et al.* - 2004. -Vol. 94. - P. 156-158.