

ДІАГНОСТИКА РРСС, ЗУМОВЛЕНОГО ЗБУДНИКОМ ЄВРОПЕЙСЬКОГО ТИПУ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР У ФОРМАТІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

Є. В. Смолянінова, О. С. Солодянкін, А. І. Бузун, А. П. Геріловіч

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

На сьогодні однією з головних причин репродуктивних розладів у свиноматок можна назвати вірусні хвороби, серед яких не останнє місце займає репродуктивно респіраторний синдром (РРСС), тому дуже важливо своєчасно, швидко та достовірно встановити причину хвороби тварин. Метою нашої роботи є проведення відпрацювання протоколу ПЛР у форматі реального часу з використанням TaqMan-зондів та SYBR-Green. Робота виконана з використанням молекулярно-генетичних та біоінформатичних методів. У статті представлені результати відпрацювання протоколу ПЛР у форматі реального часу з використанням TaqMan-зондів та SYBR-Green-детекції. Встановлено, що методика з використанням специфічного зонду є більш чутливою, ніж методика з використанням SYBR-Green тому, що детекція напрацьованої ДНК при використанні TaqMan-зондів почалась із 14 циклу, а при використанні SYBR-Green — з 25 циклу.

Свинарство є однією з найприбутковіших галузей сільського господарства, але підприємці, які займаються розведенням поголів'я, стикаються з проблемами, що призводять до суттєвих економічних збитків: вірусні, бактеріальні та паразитарні захворювання, недоброякісні корма та інше [6]. Перш за все необхідно відзначити проблеми, пов'язані з репродуктивними розладами — неплідність або малоплідність кнурів та свиноматок, низький коефіцієнт запліднюваності, народження нежиттєздатного приплоду, аборти та мертвонародження. На сьогодні головною причиною цих проблем є вірусні хвороби, такі як репродуктивно-респіраторний синдром (РРСС), цирковірусна інфекція свиней II типу (ЦВІС) та парвовірусна інфекція свиней (ПВІС) [3].

РРСС — вірусне контагіозне захворювання головним чином свиноматок, що характеризується абортами, мертвонародженням поросят, передчасним опоросом, респіраторними порушеннями. Збудник хвороби — РНК-вмісний артеріовірус (рід *Arterivirus*, родина *Arteriviridae*) розміром 45–65 нм [2]. Вірус має зовнішню оболонку, що зумовлює його стійкість у довкіллі, проте чутливий до ліпідних розчинників. У замороженому матеріалі зберігається до трьох років. Однак, дезінфектанти в звичайних концентраціях легко його інактивують [2]. У літературі описано два генотипи вірусу: Американський та Європейський. Але в кожному типі існує безліч варіантів, які мають антигенну спорідненість, демонструючи перехресну імуногенність [5].

Інкубаційний період РРСС триває від двох тижнів. При первинному заносі збудника до господарства, хвороба протікає, як правило, гостро, з порушенням репродуктивної функції. Відзначаються прохолости, аборти на пізніх термінах супоросності, збільшення температури у супоросних свиноматок до 41,5 °С, а також народження мертвих, нежиттєздатних поросят [6]. У поросят післявідлучного віку розвивається респіраторний синдром з ознаками гострої серцевої недостатності. При хронічному перебігу в стаціонарно неблагополучних господарствах хвороба характеризується періодичним збільшенням прохолоста, народженням слабких поросят. У поросят відлучного віку розвивається респіраторний синдром,

обумовлений взаємодією вірусу PPRC і цирковірусу. При цьому процес також обтяжується секундарною бактеріальною мікрофлорою [2].

PPRC дуже часто протікає в асоціації з іншими вірусними та бактеріальними захворюваннями: ЦВІС, ПВІС, мікоплазмозною плевропневмонією, пастерельозом тощо. Дуже важливо своєчасно, швидко та достовірно встановити причину хвороби тварин, щоб вчасно вилучити одну зі складових ланок епізоотологічного процесу та розпочати профілактичні заходи. Діагноз на PPRC ставлять на підставі клінічних даних та лабораторних досліджень. Для виділення вірусу використовують клінічний матеріал: кров, сироватку або плазму крові. А також патологоанатомічний матеріал : шматочки паренхіматозних органів (легені, селезінка), плевральна та перикардальна рідина, паренхіматозні органи абортплодів [6]. Для виявлення антитіл чи антигенів використовують ІФА, РНГА, РН, непрямий РІФ, для детекції та індикації генетичного матеріалу вірусу використовують ПЛР, у тому числі ПЛР у форматі реального часу [4].

Мета дослідження — відпрацювання протоколу ПЛР у форматі реального часу з використанням TaqMan-зондів та SYBR-Green.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на базі лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Матеріал для досліджень був відібраний з позитивних зразків архіву лабораторії, що надійшли з господарств Харківської, Сумської і Полтавської областей впродовж 2013–2014 рр., та заморожений за температури (мінус 70±5) °С. Для позитивного контролю використовували живу вірус-вакцину Porcilis PRRS штам DV (виробник Інтервет Інтернешенл Б.В. Боксmeer, Нідерланди).

Дослідження проводили двома методами: перший — постановка ПЛР у реальному часі за флуорисцентною детекцією з SYBR-Green, другий — постановка ПЛР у реальному часі з набором для Master Mix «AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit». В обох випадках ізоляція вірусної РНК проводили за методом Хомчинського [1]. Для реакції використовували зонд та пару праймерів, які у своїй статті описував Steven B Kleiboeker [3].

Таблиця 1

Послідовність олігонуклеотидів для детекції вірусу PPRC європейського типу

Праймер	Послідовність праймеру	Послідовність зонду	Ген банк Асс #
European PRRSV	For GCACCACCTCACCCAGAC(14,792-14,809) Rev CAGTTCCTGCGCCTTGAT(14,851-14,868)	CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC (14,819-14,842)	M96262

Під час роботи з методом ПЛР у режимі реального часу з флуорисцентною детекцією з використанням SYBR-Green після ізоляції сумарної РНК була проведена зворотна транскрипція комерційним набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (ThermoSCIENTIFIC), за наступним протоколом: oligo (dT₁₈) — 1 мкл, water nuclease free — 5 мкл, РНК проба — 5 мкл 65 °С — 5 хв.; 5 x Reaction Buffer — 4 мкл; Ribolock RNase inhibitor (20 m/ml) — 1 мкл; 10 mП dNTP Mix — 2мкл; M-Mul V Revers Transcription (20 m/ml) — 2 мкл 37 °С — 60 хв., 70 °С — 5 хв.. При роботі методом ПЛР у режимі реального часу з набором для Master Mix «AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit» використовували зонд з флуорисцентною міткою FAM на 5'-кінці та гасителем флуорисценції HBQ1 на 3'-кінці за наступним протоколом: 2x RT-PCR Buffer — 12,5мкл, 25x RT-PCR Enzyme Mix — 1 мкл, Detection Enhancer — 1,5 мкл, TaqMan зонд — 1 мкл, праймери PRRSV F/R по 1 мкл. Для ПЛР у режимі реального часу з флуорисцентною детекцією з використанням SYBR-Green використали наступний температурний режим: 95 °С (60 сек.), далі 35 циклів денатурація (94 °С, 15 сек), відпал (58 °С, 60 сек), елонгація (72 °С, 30 сек); для ПЛР у режимі реального часу з використанням TaqMan -зондів використали наступний температурний режим: 45 °С (10 хв.), 95 °С (10 хв.), далі 35 циклів денатурація (95 °С 15 сек.), відпал (58 °С, 60 сек.), елонгація (72 °С, 30 сек.).

Результати й обговорення. На першому етапі наших досліджень був відпрацьований протокол ПЛР у реальному часі за флуорисцентною детекцією з SYBR-Green. У процесі роботи необхідно було підібрати кількість циклів, що було зумовлене наявністю інтеркалюючого барвника, який зв'язується з будь-якою двоспіральною нуклеотидною послідовністю, і проявляє флуорисцентні властивості ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), що дозволяє його використовувати при постановці ПЛР у форматі реального часу [4]. Саме тому, що SYBR-Green інтегрується неспецифічність у двоспіральних фрагментах, завелика кількість циклів, більш 35, давала позитивний результат у негативному контролі, що зумовлювалось напрацюванням димерів праймерів. У нашому дослідженні детекція напрацьованої ДНК почалась з 25 циклу, що вважається допустимим показником у застосуванні даної методики (рис. 1, табл. 2) [4]. Для підтвердження напрацювання специфічної ділянки ДНК було проведено електрофоретичний аналіз (довжина амплікона 76 п.н.) (рис. 3).

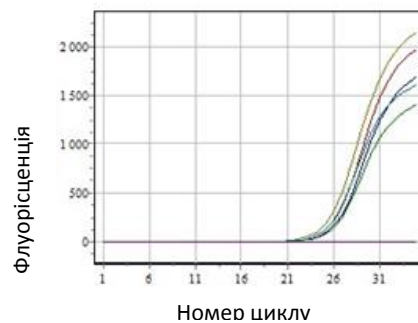


Рис. 1. Криві формування ПЛР продукту кДНК вірусу РРСС при використанні інтеркалюючого барвника SYBR-Green

Таблиця 2

Результати ПЛР – аналізу з використанням інтеркалюючого барвника SYBR – Green

Номер лунки	Ідентифікатор пробірки	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
A1	Зразок 1 (TEST)	25,8	–	+
A2	Зразок 2 (TEST)	25,9	–	+
A3	Зразок 3 (TEST)	26,0	–	+
A4	Зразок 4 (TEST)	25,2	–	+
A5	К + (TEST)	25,3	–	+
A6	К - (TEST)	–	–	нд

На другому етапі досліджень проводилась відпрацювання протоколу ПЛР у режимі реального часу з набором для Master Mix «AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit». Результати біоінформатичного аналізу показали, що теоретично температура відпалу праймерів E PRRSV становить 58 °С, а температура відпалу для зонду складає 58,9 °С. Після корегування термодинамічних показників реакції з урахуванням впливу солей, нами була встановлена температура 60 °С як оптимальна для відпалу усього комплексу застосованих олегонуклеотидів. За таких умов постановки реакції детекція напрацьованого ДНК-фрагменту почалась з 14 циклу, що свідчило про більшу чутливість методу у порівнянні з попереднім методом (рис. 2, табл. 3). Результати проведеного дослідження підтверджені електрофоретичним аналізом (рис. 3).



Рис. 2. Криві формування ПЛР продукту кДНК вірусу РРСС при використанні TaqMan-зондів

Таблиця 3

Результати ПЛР-аналізу з використанням TaqMan-зондів.

Номер лунки	Ідентифікатор пробірки	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
A1	Зразок 1 (TEST)	14,3	–	+
A2	Зразок 2 (TEST)	14,3	–	+
A3	Зразок 3 (TEST)	20,3	–	+
A4	Зразок 4 (TEST)	19,3	–	+
A5	К + (TEST)	17,5	–	+
A6	К - (TEST)	–	–	нд

Зважаючи на те, що Kleiboecker S. В. у своїй роботі не враховував можливості використання праймерів без зондів, під час нашої роботи ми проводили дослідження 20 зразків клінічного матеріалу (крові), які надійшли до лабораторії з господарств Харківської, Сумської та Полтавської областей. Дослідження походились з використанням олігонуклеотидних послідовностей з зондом та без нього. Отримані результати не виявили неспецифічних напрацювань. Було встановлено, що реакція, яка проходила з використанням специфічного зонду, виявилась більш чутливою, тому що напрацювання ДНК відбувалося на 14-20 циклах, тоді як в реакції з використанням SYBR-Green напрацювання у потрібній кількості копій специфічної ділянки ДНК відбувалося на 25 циклі. Хоча треба відмітити, що SYBR Green з даними праймерами також може бути використано у клінічній діагностиці, так як напрацювання ДНК у задовільній для детекції кількості з 25 циклу вважається допустимою діагностичною нормою та крім того при використанні SYBR-Green відпадає необхідність синтезу зондів.

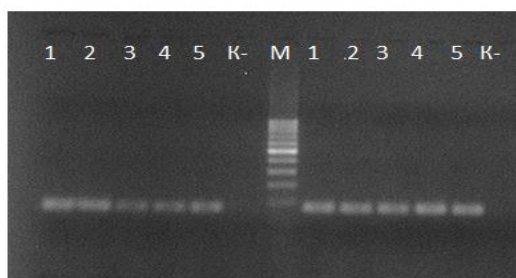


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР при ампліфікації кДНК з РНК- матриці матеріалів вірусу PPRC

В И С Н О В К И

У результаті проведених досліджень встановлено, що методика з використанням ТаqМан –зондів, які у своїй роботі описав Kleiboecker S. В., має більш аналітичну чутливість, ніж методика з використанням інтеркалюючого барвника SYBR-Green, адже методика з використанням ТаqМан-зондів починає детекцію напрацьованого фрагменту ДНК з 14 циклу, а методика з використанням інтеркалюючого барвника SYBR-Green з 25 циклу.

Перспективи подальших досліджень. Результати наших досліджень у подальшому будуть використані для роботи у напрямку мультиплексної ПЛР у форматі реального часу.

THE PRRS DIAGNOSIS CAUSED BY THE EUROPEAN TYPE PATHOGEN BY REAL-TIME PCR

E. V. Smolyaninova, O. S. Solodiankin, A. I. Buzun, A. P. Gerilovich

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

S U M M A R Y

Today, a major cause of reproductive disorders in sows is the viral diseases, including the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), so it is important to determine the cause of animal diseases timely, quickly and accurately. The aim of our work is to carry out the Real-time PCR protocol using TaqMan - probes and SYBR-Green. Work was carried out using molecular genetic techniques and bioinformatics. The results of Real-time PCR with Taq man - probe and SYBR-Green detection were submitted in this article. There was found that the method with a specific probe is more sensitive than method using SYBR-Green, because the DNA detection by the method using Taq man - probe began on 14 cycles and by the method with SYBR-Green - 25 cycles.

ДИАГНОСТИКА РРСС, ПРЕДОПРЕДЕЛЕННОГО ВОЗБУДИТЕЛЕМ ЕВРОПЕЙСКОГО ТИПА С ПОМОЩЬЮ ПЦР В ФОРМАТЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Е. В. Смолянинова, О. С. Солодянкин, А. И. Бузун, А. П. Герилович

Национальный научный центр "Институт экспериментальной
и клинической ветеринарной медицины"

А Н Н О Т А Ц И Я

На сегодня одной из главных причин репродуктивных расстройств у свиноматок можно назвать вирусные болезни, среди которых не последнее место занимает репродуктивно респираторный синдром (РРСС), потому очень важно своевременно, быстро и достоверно установить причину болезни животных. Целью нашей работы является проведение отработки протокола ПЛР в формате реального времени с использованием TaqMan-зондов и SYBR - Green. Работа выполнена с использованием молекулярно-генетических и биоинформатических методов. В статье представлены результаты отработки протокола ПЛР в формате реального времени с использованием TaqMan-зондов и SYBR - Green - детекции. Установлено, что методика с использованием специфического зонда является чувствительнее, чем методика с использованием SYBR - Green потому, что детекция наработанной ДНК при использовании TaqMan-зондов началась из 14 цикла, а при использовании SYBR - Green - из 25 цикла.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Chomczynski P. A. Single step method of RNA isolation by acid and guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [Text] / Chomczynski P, N Sacchi // Anal. Biochem.— 1987. — Vol. 162, № 1. — P. 156–159.*
2. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин [и др.]. — М. : ВНИТИБП, 1998. — 928 с.
3. *Kleiboeker S. B. Development of Real-time, multiplex PCR/RT-PCR assays for improved PRDC pathogen detection [Electronic resource] :research report / Kleiboeker S.B. ; Univ. of Missouri. — June 28, 2004. — Mode to acces: URL: <http://www.pork.org/FileLibrary/ResearchDocuments/03-114-KLEIBOEKER/6-28-04/pdf>.—Title from the screen.*
4. ПЦР «в реальном времени» [Текст] / Д. В. Ребриков [и др.] ; под ред. д.б.н. Д. В. Ребрикова.— 2-е изд., испр. и доп. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. — 223с.
5. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic [Text] / J.E Butler [et al.] // Immunol. Res. — 2014. — Vol.59, № 1–3.— P. 81–108.
6. A sensitive multiplex real-time PCR panel for rapid diagnosis of viruses associated with porcinerespiratory and reproductive disorders [Electronic resource] H [et al.] // Mol Cell Probes. — Available online 18 July 2014.—Mode to access: URL: <http://www:sciencedirect.cjm/sciencee/article/pii/S0890850814000395>. — Title from the screen.