

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ДВОХ МОДИФІКАЦІЙ ПЛР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ

Є. В. Смолянінова, аспірант
Н. Г. Рудова, аспірант
А. П. Герілович, д-р вет. наук, с. н. с.

Національний науковий центр
«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61000, Україна

На сьогодні однією з найбільших проблем сучасного свинарства є респіраторно-репродуктивні віרוзи свиней, які суттєво впливають на рентабельність свинарства та призводять до значних економічних збитків у цій галузі. Для діагностики цих інфекцій використовують молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема ПЛР класичного формату та у режимі реального часу. Проведено порівняльний аналіз ефективності застосування двох модифікацій ПЛР для діагностики цирковірусної інфекції свиней серед свинопоголів'я з різним статусом здоров'я. Встановлено, що ПЛР у форматі реально часу є більш чутливим тестом, проте ПЛР стандартного формату не поступається в таких показниках якості як достовірність отриманих результатів та специфічність.

Ключові слова: ЦВІС, ПЛР, RT-ПЛР, ДНК-матриця, ЦВС-II.

На сьогоднішній день для України сільськогосподарське виробництво і його тваринницька складова відіграють важливе соціальне та економічне значення. Економічна доцільність ведення свинарства тісно пов'язана з продуктивністю тварин та дотриманням технології отримання тваринницької продукції. Перепоною для одержання якісної та безпечної для споживачів продукції свинарства нерідко стають вірусні інфекції. Найбільшою проблемою сучасного тваринництва є респіраторно-репродуктивні віруси свиней (РРВС) – репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС), цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС), мікоплазмоз та їх асоціації, які суттєво впливають на рентабельність свинарства, біобезпеку харчового ланцюга людини та екологічну ситуацію в цілому [1]. Будь-які проблеми репродукції (неплідність або малоплідність кнурів та свиней, низький коефіцієнт запліднюваності, народження нежиттєздатного приплоду, аборти та мертвонародження) призводять до значних економічних збитків галузі промислового свинарства.

Для діагностики РРВС використовують молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), проведення якої не потребує цілісності структур збудника та збереження його біологічної активності. У лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» для детекції генетичного матеріалу збудників респіраторно-репродуктивних вірусів свиней, зокрема РРСС та ЦВІС, широко застосовують метод класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу [2].

Результати досліджень зразків клінічного матеріалу щодо наявності ДНК збудника ЦВС-II, отримані Zong-zhao Y. та ін., свідчать про те, що метод ПЛР у режимі реального часу є більш чутливим та специфічним, у порівнянні з традиційною ПЛР [3].

На думку дослідників Chung W. B. та ін. звичайна ПЛР трудомістка та схильна до попередньої контамінації, що збільшує ризик виникнення хибно-негативних результатів. ПЛР у режимі реального часу є більш легким та надійним тестом і значно поширена в

застосуванні при розробці вакцинних препаратів, дослідженні патогенезу захворювання тощо [4].

Тому, метою наших досліджень було провести порівняний аналіз ефективності застосування двох модифікацій ПЛР для діагностики ЦВІС серед свинопоголів'я.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися на базі відділу молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ЛЕКВМ», який укомплектований основним аналітичним та допоміжним обладнанням, необхідним для здійснення молекулярно-діагностичних тестувань.

Для проведення досліджень були використані зразки (n=121) клінічного матеріалу від тварин з неблагополучних господарств: патологічний матеріал від тварин, що загинули або вимушено забиті (шматочки паренхіматозних органів, лімфатичних вузлів), а також кров, сперму від тварин, підозрюваних у вірусносійстві, плаценту та шматочки органів аборт-плодів у випадках мертвонародженості та абортів у свиноматок.

Флакони з патматеріалом транспортували у термосі з льодом, заморожену сперму — у контейнері з рідким азотом у день відбору матеріалу, але не пізніше, ніж через 24 години після відбору. Матеріал доставляли до лабораторії з дотриманням заходів, які попереджують поширення збудника інфекції.

Екстракцію нуклеїнових кислот із дослідних зразків здійснювали за методом афінної сорбції. Для проведення ПЛР у звичайному форматі використовували базові набори «PCR-Core» виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація) та систему праймерів PCV2_ F/R. ПЛР-аналіз проводили відповідно до протоколу:

- 1 крок: денатурація – 94 °С – 2 хв – 1 цикл;
- 2 крок: денатурація – 94 °С – 30 сек,
відпал – 60 °С – 30 сек,
синтез – 72 °С – 30 сек; усього – 40 циклів;
- 3 крок: елонгація – 74 °С – 4 хвилини – 1 цикл.

Довжина амплікону дорівнювала 408-421 пар нуклеотидів (п. н.).

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим, за напруги електричного поля $U = 120$ В протягом 25 хвилин та подальшої їх візуалізації в УФ-світлі з використанням транслюмінатора.

Для проведення ПЛР у режимі реального часу було використано базові набори Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) фірми Thermo Scientific (США) та систему праймерів PCV-2 F/R [5].

Результати й обговорення. З метою вивчення ефективності застосування двох модифікацій ПЛР для діагностики ЦВІС досліджували 121 зразок різного клінічного матеріалу від свиней з господарств Запорізької, Харківської, Полтавської, Сумської, Дніпропетровської, Херсонської та Одеської областей (частина матеріалу люб'язно надана лабораторією вивчення хвороб свиней ННЦ «ЛЕКВМ»).

При цьому клінічні ознаки захворювання були надзвичайно різноманітними: респіраторні розлади, розлади органів репродуктивної системи та змішаний перебіг захворювання.

На першому етапі наших тестувань зразки були досліджені у ПЛР класичного формату. Генетичний матеріал ЦВІС-II був детектований у 60 зразках клінічного матеріалу, що склало 49,6% від загальної кількості досліджуваних зразків. На другому етапі усі зразки були досліджені методом ПЛР у режимі реального часу (рис.). При цьому генетичний матеріал ЦВІС-II був детектований у 65 зразках клінічного матеріалу, що склало 53,7%.

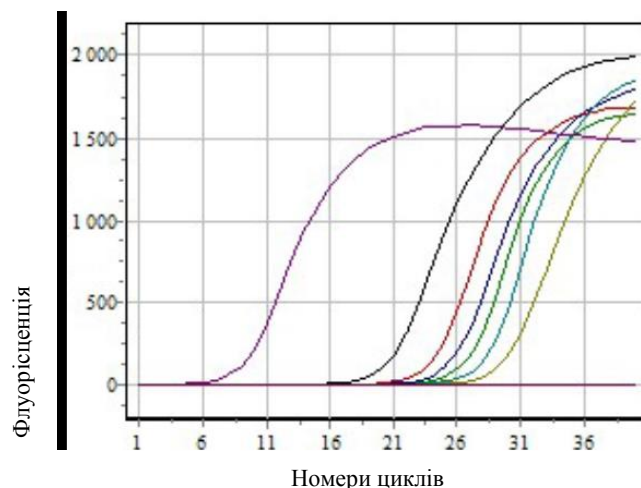


Рис. Криві формування ПЛР продукту ДНК цирковірусу свиней другого типу при використанні інтеркалюючого барвника SYBR – Green

Отримані результати досліджень були зведені то таблиці та проаналізовані (табл.).

Таблиця

Порівняння результатів дослідження клінічного матеріалу від свиней щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II методом класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу

Результати досліджень методом класичної ПЛР	Результати досліджень методом ПЛР у режимі реального часу		
	Позитивні	Негативні	Усього зразків
Позитивні	60	0	60
Негативні	5	56	61
Усього зразків	65	56	121

При цьому нами було встановлено, що усі зразки, позитивні щодо наявності ДНК ЦВС-II у класичній ПЛР, були також позитивними у RT-ПЛР, тоді як частина зразків (n=5), негативних щодо наявності генетичного матеріалу збудника ЦВС-II у класичній ПЛР були позитивними у RT-ПЛР. Проте, напрацювання специфічного фрагменту ДНК збудника у цих зразках відбувалось з 30-31 циклів, що може свідчити або про замалу кількість первинної ДНК-матриці збудника або про напрацювання димерів праймерів [6]. Таким чином, можна припустити, що ПЛР у форматі реального часу є більш специфічною та дає змогу візуально спостерігати напрацювання специфічно фрагменту збудника, проте більш економічно витратна (враховуючи використання специфічних барвників та зондів), тоді як класична ПЛР є більш придатною для використання не тільки в діагностиці, а і для підготовки зразків з метою проведення подальших молекулярно-генетичних досліджень – секвенування, клонування тощо. Це робить обидві модифікації ПЛР конкурентоспроможними та придатними до застосування.

ВИСНОВКИ

Результати проведених досліджень свідчать про значне поширення ЦВС-II серед свинопоголів'я господарств України, що викликає першочергову необхідність проведення поглиблених досліджень з метою розробки більш ефективних заходів щодо контролю цирковірусної інфекції серед тварин. Для детекції генетичного матеріалу збудника у клінічному матеріалі можуть бути використані обидві модифікації ПЛР (стандартна та у режимі реального часу). Вони є достатньо ефективними та затребуваними у діагностиці вірусних інфекцій свиней.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на удосконалення існуючих методів діагностики цирковірусної інфекції свиней, а також буде вивчено генотипову належність цирковірусів свиней, що циркулюють серед свинопоголів'я у господарствах України, на підставі чого буде встановлено географічне походження цих вірусів, досліджено зв'язок між патогенними властивостями й формами перебігу ЦВІС та генетичними характеристиками вірусу.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICACY OF TWO MODIFICATION OF PCR FOR THE DIAGNOSIS OF PORCINE CIRCOVIRUS INFECTION

E. V. Smolyaninova, N. G. Rudova, A. P. Gerilovich

National Scientific Center
"Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
83, Pushkinska str., Kharkiv, 61000, Ukraine

S U M M A R Y

Today one of the most significant problems of current pig production is respiratory reproductive viral infections pigs that significantly affect the profitability of pig production and lead to significant economic losses in this industry. For the diagnostic of these infections using molecular genetic research methods, particularly classical PCR and real time PCR. An analysis compared the efficacy of two modifications of PCR for diagnosis porcine circovirus infection among pigs populations with different health status. Established that the PCR of real time format is more sensitive test, PCR standard format but not inferior in terms of quality as the reliability of the results and specificity.

Keywords: CVIP, PCR, RT-PCR, CVP-II.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДВУХ МОДИФИКАЦИЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Е. В. Смолянинова Е.В., Н. Г. Рудова, А. П. Герилевич

Национальный научный центр
«Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»,
ул. Пушкинская, 83, г. Харьков, 61000, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

На сегодняшний день одной из самых больших проблем современного свиноводства являются респираторно-репродуктивные вирозы свиней, которые существенно влияют на рентабельность свиноводства и приводят к значительным экономическим убыткам в этой области. Для диагностики этих инфекций используют молекулярно-генетические методы исследований, в частности ПЦР классического формата и в режиме реального времени. Проведен сравнительный анализ эффективности применения двух модификаций ПЦР для диагностики цирковірусної інфекції свиней среди свинопоголовья с разным статусом здоровья. Установлено, что ПЦР в формате реального времени является более чувствительным тестом, однако ПЦР стандартного формата не уступает в таких показателях качества как достоверность полученных результатов и специфичность.

Ключевые слова: ЦВІС, ПЛР, RT-ПЛР, ДНК-матрица, ЦВС-II

ЛІТЕРАТУРА

1. Етіологічна структура цирковірусу – асоційованих свиней в господарствах східного регіону України [Текст] / А. П. Герілович [та ін.] // Вісн. аграр. науки. — 2011. — № 1. — С. 34-36.
2. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях [Текст] / під ред. Б. Т. Стегнія // Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2010. — 258 с.
3. Yang Z. Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR [Text] / Yang Zong-zhao, Habib Mudasser, Shuai Jiang-bing, Fang Wei-huan // J. Zhejiang Univ Sci B. — 2007. — № 8(3). — P. 162–169.
4. Chung W. B. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturallyinfected and challenged pigs. [Text]/ Chung W. B.[et al.] // J. Virol Methods. — 2005. — Vol.124 (1-2). — P. 11–19.
5. 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 tht screen.
6. 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. — 223 с.

Рецензент — В. І. Болотін, к. вет. н., ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,