

Випробування методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу H5N1

Анотація: Проведено визначення чутливості, специфічності та відтворюваності методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу субтипу H5N1. Встановлено, що дані показники є високими. Обґрунтовано, що перспективним є впровадження в практику лабораторій ветеринарної медицини України RT – LAMP як експрес-методу діагностики пташиного грипу.

Ключові слова: вірус пташиного грипу, діагностика, метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот, специфічність, чутливість, відтворюваність.

Test of method of isothermal amplification of nucleic acids of virus of bird flu of H5N1. MARYNA SAPACHOVA¹ doctor of Veterinary Medicine, graduate student, POSTOYENKO² doctor of Agriculture, KARPULENKO³ candidate of Veterinary Sciences (¹State Scientific Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise, Kyiv. ²Institute of Veterinary Medicine NAAS, Kyiv ³Ukrainian State Research Institute Nanobiotechnologies and Resource, Kyiv; (State Scientific Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise, Institute of Veterinary Medicine NAAS, Ukrainian State Research Institute Nanobiotechnologies and Resource, Kyiv)

Abstract. The determination of sensitivity, specificity, and reproducibility of the method of isothermal nucleic acid amplification avian influenza virus subtype H5N1 was made. Found that these indicators are high. Substantiated that the promising is the implementation in practice of veterinary medicine laboratories of Ukraine RT - LAMP as express – method of avian influenza diagnosis.

Key words: avian influenza diagnosis, isothermal nucleic acid amplification, specificity, sensitivity, reproducibility.



Рецензенти: канд. вет. наук **М. В. Бабкін** (ДНКІБШМ); докт. вет. наук **В. Л. Коваленко**, Інститут ветеринарної медицини НААН

**М. САПАЧЕВА, В. ПОСТОЄНКО,
М. КАРПУЛЕНКО**

**Інститут ветеринарної медицини НААН,
Український державний науково-
дослідний інститут нанобіотехнологій та
ресурсозбереження, м. Київ**

Діагностику грипу птиці проводять комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних, патологоанатомічних змін та лабораторних досліджень [1-3].

Згідно з рекомендаціями МЕБ, лабораторна діагностика ВППГ ґрунтується на виділенні вірусу з патологічного матеріалу (трахеальних та клоачних змивів від живої птиці або проб органного матеріалу від загиблої птиці) на курячих ембріонах з наступною його ідентифікацією; молекулярно-генетичних методах; визначен-

Специфічність LAMP праймерів для визначення різних підтипів вірусу і штамів грипу птиці

No.	Найменування	Результат
1	AI influenza, subtype H ₁ N ₁	+
2	AI influenza, subtype H ₃ N ₂	+
3	AI influenza, subtype H ₅ N ₁	+
4	AI influenza, subtype H ₅ N ₂	+
5	AI influenza, subtype H ₇ N ₁	+
6	AI influenza, subtype H ₉ N ₃	+
7	AI influenza, subtype H ₅ N ₁ , UA strain A/hen/SivashBay/02/05	+
8	AI influenza, subtype H ₅ N ₁ , UA strain A/hen/Primorsky/02/06	+
9	AI influenza, subtype H ₅ N ₁ , UA strain A/hen/Krasnohvardysky/58/08	+
10	AI influenza, subtype H ₅ N ₁ , UA strain A/hen/Krasnohvardysky/59/08	+
11	AI influenza subtype, H ₅ N ₁ , UA strain A/hen/Krasnohvardysky/60/08	+
12	Negative control: Newcastle disease virus, strain La Sota	-
13	Negative control: Infectious bronchitis virus, strain Massachusetts H120	-
14	Negative control: Infectious laryngotracheitis virus, strain VNIIBB-U	-
15	Negative control: Infectious bursal disease virus, strain BER-93	-
16	Negative control: Egg drop syndrome virus, strain L-497	-
17	Negative control: Salmonella gallinarum pulorum	-
18	Negative control: Mycoplasma gallisepticum	-
19	Negative Control: no DNA	-

ні інтравенозного індексу патогенності; серологічних тестах – доступні для виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу типу А: імуоферментний аналіз (ІФА), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) [2-3].

Важливе місце займають експрес-діагностика тому, що виникає необхідність швидкого одержання результатів дослідження. Серед них широкого практичного значення набуває метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але, на жаль, проведення ПЛР аналізу вимагає використання дорогого обладнання та реактивів, і тому не завжди доступним для лабораторій, що мають ресурсні обмеження.

Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес-методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов. Одним із таких є новий метод, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (LAMP) [9, 11].

Було раніше нами розроблено і підбрано умови для проведення LAMP [4]. Але для широкого впровадження в практику необхідно визначити чутливість, специфічність та відтворюваність даного методу.

Тому метою даної роботи є визначення чутливості, специфічності та відтворюваності методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу субтипу H5N1.

У дослідженнях використовували розроблений нами раніше метод LAMP для ідентифікації вірусу пташиного грипу субтипу H5N1. Склад реакційної суміші та умови реакції були описані нами [4].

Для визначення специфічності у порівняльному аспекті проаналізовано набір з вірусу пташиного грипу різних субтипів – H1N1, H3N2, H5N1, H5N2, H7N1, H9N3, а також гетерологічні штами вірусу хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту курей, інфекційного ларинготрахеїту, вірусу бурсальної хвороби, синдрому зниження несучості, сальмонели, мікоплазми галісектікум та патологічний матеріал від здорової птиці (табл. 1).

Для визначення чутливості RT-LAMP використовували кДНК референтного штаму вірусу грипу птиці субтипу H5N1 з різними концентраціями від 0,01 до 10 нг на пробу, наданий ННЦІЕКВМ (м. Харків) (рис. 1, 2).

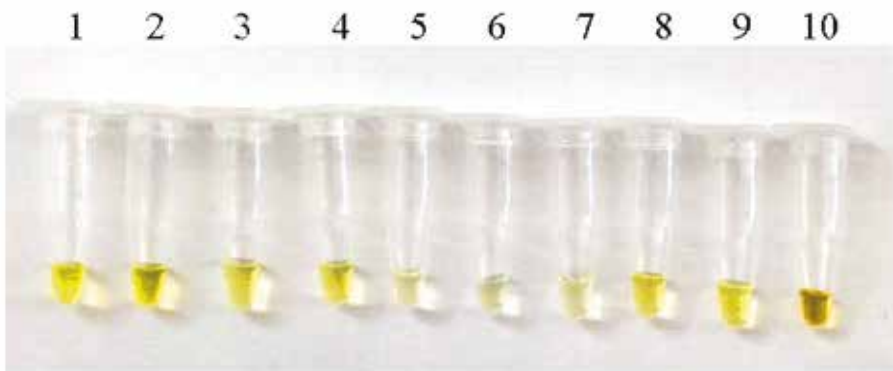


Рис. 1 Візуальна детекція продуктів RT – LAMP, виконана з різними концентраціями кДНК вірусу грипу птиці (нг на пробу):

1 – 10; 2 – 5; 0, 3 – 1,0; 4 – 0,1; , 5 – 7 – 0,01; 8-9 – 0,1; 10- негативний

Дані, представлені на рис. 1, свідчать, що чутливість цього методу дорівнює 0,1 нг на пробу. Найбільш чітко забарвлення спостерігали на рівні розведення кДНК вірусу грипу птиці від 10 до 0,1 нг на пробу. Лесть помітне забарвлення було в інших розведеннях кДНК референтного штаму. Цей показник відповідає світовим вимогам. Дані літератури показують, що чутливість LAMP при детекції грипу птиці субтипу H5 та H7 дорівнює 0,1 нг на пробу [8].

Відтворюваність методу LAMP визначали шляхом використання трьох повторностей референтного штаму вірусу пташиного грипу субтипу H5N1 у концентраціях 0,1 та 0,01 нг на пробу (рис. 1).

За негативний зразок брали виділену кДНК з патологічного матеріалу від здорової птиці.

Результати дослідження. Результати визначення специфічності методу LAMP представлені в табл.

З даних таблиці видно, що позитивний результат ампліфікації був відмічений у позитивних пробах референтних штамів різних субтипів – H1N1, H3N2, H5N1, H5N2, H7N1, H9N3. При цьому в інших пробах, що відповідали іншим (гетерологічним) штамам та клінічному матеріалі від здорової птиці, результат ампліфікації був негативним, що свідчило про специфічність розробленого методу.

Після встановлення специфічності методу LAMP були проведені випробування по визначенню чутливості та відтворюваності даного методу. Результати представлені на рис. 1, 2.

Щоб підтвердити наш висновок, матеріали візуальної детекції LAMP дослідили електрофоретично (рис.2). Як видно на рис. 2, найбільш чіткі специфічні смужки на трансільюмінаторі спостерігали на рівні розведення кДНК референтного штаму грипу птиці від 10 до 0,1 нг (трек 1 - 4). Проте, як видно на рис. 2, референтні проби з концентрацією 0,01 нг на пробу (трек 5 - 7) можуть давати негативний результат. Можна з впевненістю зазначити, що чутливість методу LAMP знаходиться в межах від 0,01 до 0,1 нг на пробу.

З літературних джерел відомо, що найбільш наближеною чутливістю для методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот є показник чутливості полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Він знаходиться в межах від 0,01 до 0,1 нг на пробу [7].

Як бачимо на рис. 2, при визначенні відтворюваності даного методу в трьох повтореннях у трьох позитивних пробах референтного матеріалу з визначеною концентрацією 0,01 нг інтенсивність флуоресценції були однаковими та виявлялись аналогічно позитивному контролю (референтному штаму ВПП).

За результатами цих досліджень доведено високу чутливість, специфічність і відтворюваність методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу.

Висновки

Нами розроблено реакцію ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот для визначення вірусу грипу птиці субтипу H5N1.

Встановлено, що за специфічністю вона є родовою.

Чутливість реакції в межах 0,01-0.1 нг на пробу.

М 1 2 3 4 5 6 7

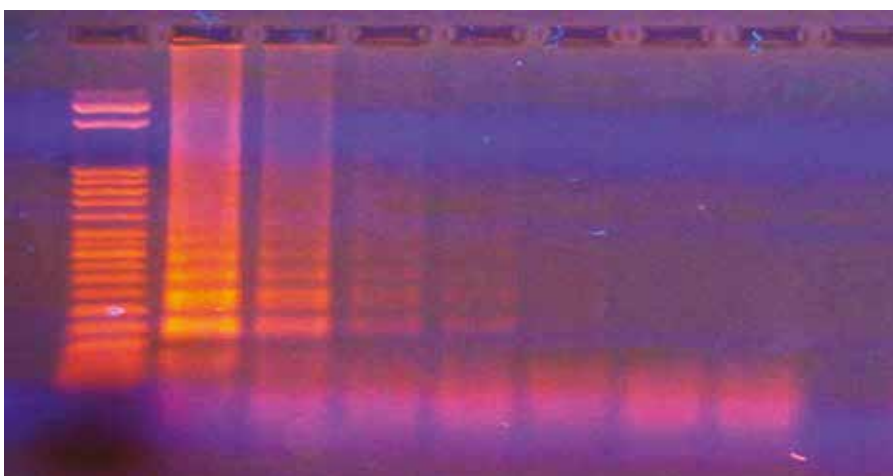


Рис. 2. Електрофоретична детекція продуктів RT – LAMP, виконана з різними концентраціями кДНК вірусу грипу птиці (нг на пробу):

М – маркер молекулярної маси, 1 – 10,0, 2 – 5,0, 3 – 1,0, 4 – 0,1, 5-7 – 0,01.

У наступних дослідженнях рекомендовано використовувати метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот у польових умовах. Це дасть змогу своєчасно контролювати занесення збудника на територію країни.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Прискока В.А. та ін.** *Діагностика інфекційних захворювань тварин: теорія і практика.* – К.: ДНДІЛДВСЕ, 2014. – 454 с.
2. **Головка А.Н., Ушкалов В.А., Скрыпник В.Г., Стегний Б.Т. и др.** *Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие.* – Х.: «НТМТ», 2007. – 512с.
3. **Бакулов И.А., Котляров В.М., Донченко А.С. и др.** *Особо опасные болезни животных. Справочное пособие.* – Новосибирск, 2002. – 184 с.
4. **Постоєнко В.О., Сорочинський Б.В., Сапачова М.А.** *Оптимізація умов проведення ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу H5N1 // Наукове видання. Науково-технічний бюлетень.* – 2013. – Вип. 14. – С. 325–330.
5. **Белюсова Р. В., Троценко Н. И., Преображенская Э. А.** *Практикум по ветеринарной вирусологии.* – М.: Колос, 2006. – 248 с.
6. **Capua I., Marangon S., dallaPozza M. et al.** *Avian Influenza in Italy 1997-2001 // AvianDis.* – 2003. – Vol. 47. – P. 839–843.
7. **Postoienko V.O., Sapacheva M.A., Spyrydonov V.G., Mandygra M.** *Comparative analysis of sensitivity of RT-LAMP and RT-PCR methods for identification of avian influenza virus H5N1.*
8. **Francesca Sidoti, Francesca Rizzo, Cristina Costa et al.** *Development of a Real – Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes // Mol.Biotechnol.* – 2010. – Vol 44:41-50. – P. 41–50.
9. *Highly pathogenic avian influenza // Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.* – 2009.
10. **Ji J., Xie Q.M., Chenandall C.Y.** *Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop – mediated isothermal amplification assay // PultruScience.* – 2010. – Vol 89: 477. – P. 477–483.
11. **Shivakoti S., Ito H., Murase T., Ono E., Takakuwa H., Yamashiro T., Otsuki.** *Development of reverse transcription – loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) assay for detection of avian influenza viruses.*

Test of method of isothermal amplification of nucleic acids of virus of bird flu of H5N1

Abstract. *The determination of sensitivity, specificity, and reproducibility of the method of isothermal nucleic acid amplification avian influenza virus subtype H5N1 was made. Found that these indicators are high. Substantiated that the promising is the implementation in practice of veterinary medicine laboratories of Ukraine RT - LAMP as express – method of avian influenza diagnosis.*

Key words: *avian influenza diagnosis, isothermal nucleic acid amplification, specificity, sensitivity, reproducibility.*

M. SAPACHOVA¹, *doctor of Veterinary Medicine*
V. POSTOYENKO² *doctor of Agriculture,*
M.KARPULENKO³ *candidate of Veterinary Sciences*
¹State Scientific Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise, Kyiv
²Institute of Veterinary Medicine NAAS, Kyiv
³ Ukrainian State Research Institute Nanobiotechnologies and Resource, Kyiv

D iagnosis of bird flu conducted comprehensively considering epizootic data, clinical, pathological changes, and laboratory studies [1-3]. According to OIE recommendations HAIV laboratory diagnosis is based on virus isolation from pathological material (tracheal and cloacal swabs of live poultry or organ samples from dead birds' material) on chicken embryos with its subsequent identification; molecular genetic methods; determining intravenous pathogenicity index; serological tests - available for the detection of specific antibodies