

УДК: 619:636.1:616.9

**ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ В ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ
ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ КОНЕЙ ПЕРШОГО ТИПУ****РАДЗИХОВСЬКИЙ М. Л.**, к. вет. наук
БЕГАС В. Л., к. вет. наук
НІКІТІН О. А., к. вет. наук*Житомирський національний агроекологічний
університет, м. Житомир*
begas.vl@mail.ru

Розроблена методика постановки полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для діагностики герпесвірусної інфекції коней першого типу та порівняно її з іншими діагностичними тестами. Підібрано оптимальні параметри проведення полімеразної ланцюгової реакції для виявлення герпесвірусу коней 1 типу. Порівняння результатів діагностичних тестів: реакції затримки гемаглютинації, реакції дифузійної преципітації та полімеразної ланцюгової реакції, показало співпадіння як позитивних, так і негативних проб між собою. Деяка розбіжність в результатах реакції затримки гемаглютинації та реакції дифузійної преципітації полягає в неодночасному утворенні гемаглютинуючих та преципітуючих антигел.

Ключові слова: герпесвірус другого типу, герпесвірусні інфекції, герпесвірус першого типу, коні, полімеразна ланцюгова реакція, ринопневмонія.

Вступ. Герпесвірусна інфекція коней першого типу спричинює значні економічні збитки галузі конярства через масові раптові аборти в другій половині жеребності, загибель лощат на 1–3 день після народження, ураження верхніх дихальних шляхів [1–3]. Герпесвірусні інфекції коней нерідко є першопричиною загибелі тварин, абортів, витрат на боротьбу та ветеринарно-санітарні заходи, вибракування цінних тварин, обмежень в міжнародній торгівлі, пересуванні коней на виставки і змагання. В комплексі заходів боротьби з герпесвірусною інфекцією коней 1 типу важливе значення має своєчасна та достовірна діагностика.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. За клінічними ознаками і патологоанатомічними змінами поставити діагноз на герпесвірусні інфекції коней важко, а у випадку персистентної інфекції неможливо [4]. Тому діагностика завжди повинна бути комплексною (клінічні ознаки, епізоотологічні дослідження, патологоанатомічні дані, лабораторні дослідження). Лабораторна діагностика у подальшому або підтвердить зроблені висновки, чи поверне процес діагностичного мислення до висхідної точки. Окремо ні один з методів не гарантує повноцінність і правильність діагнозу [5].

Варто відмітити, що за останні роки в Україні зроблено багато кроків в галузі лаборатор-

ної діагностики герпесвірусних інфекцій коней. Проте з метою належного технічного забезпечення лабораторної діагностики інфекційних хвороб коней, необхідно провести державну реєстрацію та налагодити промислове виробництво розроблених в Україні засобів діагностики ринопневмонії коней (РН, ІФА, РДП, ПЛР) [6]. В Україні існує дефіцит вітчизняних, промислово виготовлених, доступних діагностичних наборів для діагностики герпесвірусних інфекцій коней. Певний інтерес викликає також порівняльна оцінка доступних діагностичних тестів щодо герпесвірусних інфекцій коней.

Мета досліджень – розробити методику постановки полімеразної ланцюгової реакції для діагностики герпесвірусної інфекції коней першого типу. Порівняти результати отримані в полімеразній ланцюговій реакції з результатами, отриманими в інших діагностичних тестах (РЗГА, РДП).

Матеріал і методи досліджень. Постановку РЗГА та РДП проводили у відповідності з методичними рекомендаціями «Діагностика герпесвірусної інфекції першого та другого типу у коней» [7]. Розробку постановки полімеразно-ланцюгової реакції в реальному часі проводили на базі лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів та природокористу-

вання сумісно з Спірідоновим В. Г. під керівництвом Мартиненка Д. Л.

Нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів для виявлення герпесвірусу коней 1 та 2 типів (ГВК-1, 2) підібрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). Олігонуклеотидні праймери та флуоресцентні зонди синтезували амідітофосфітним методом на автоматичному ДНК синтезаторі ABI 3400 (Applied Biosystems).

При постановці полімеразно ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ) кожен зразок досліджували у двох повторях. Ампліфікацію проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, що мала наступний склад: 10x ПЛР буфер, 25 mM MgCl₂, 1,5 mM кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів, 5 пМ праймерів та 2,5 пМ флуоресцентних зондів, 20 мкМ флуоресцентного барвника ROX, 0,2 у. урацил-ДНК-глікозилази, UDG (Fermentas) та 1 у. Таq-полімерази (Fermentas). Досліджувану ДНК вносили у кількості 100–200 нг.

Ампліфікацію ДНК-мішені здійснювали на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) із наступним температурним профілем: активація UDG – 5 хв при 50°C, активація Таq-полімерази – 10 хв при 94°C, та наступні 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію 15 с при 95°C, відпалу праймерів 1 хв при 60°C, елонгацію 30 с при 72°C. Отриманні результати аналізували за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3

Основним критерієм оцінки отриманих результатів є значення граничного циклу C_t,

яке характеризує певний цикл ПЛР, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції у порівнянні із базовим рівнем.

Зразок вважали позитивним при отриманні експоненціальних кривих ампліфікації ДНК-мішені (гену gpH) та внутрішнього контролю (ген PRP), при значенні менше або дорівнює 38 (C_t ≤ 38). Зразок вважали негативним при відсутності ампліфікації ДНК-мішені та при ампліфікації внутрішнього контролю. У випадку відсутності кривої ампліфікації ДНК-мішені та значенні C_t кривої ампліфікації внутрішнього контролю більше 38, зразок вважали сумнівним і проводили повторний аналіз. За відсутності кривої ампліфікації внутрішнього контролю проводили повторне виділення ДНК із такого зразка.

Результати та їх обговорення. З аналізу нуклеотидних послідовностей виявилось, що найбільш консервативним геном у вірусів герпесу коней 1 та 2 типів є ген, що кодує глікопротеїн Н (gpH). Нуклеотидні послідовності праймерів та мічених флуоресцентними барвниками зондів представлені в таблиці 1.

Саме тому ми обрали цей ген, як ДНК-мішень для дизайну праймерів та розробки діагностичної системи методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Апробацію ПЛР системи проводили на ДНК, виділеній з вірусної культуральної рідини, яка містила герпесвірус першого типу – штаб “ГВК-Ж”. У результаті виявлено, що тільки проба №1 є позитивною на ГВК-1 (C_t 18), і підтверджує той факт, що культура клітин містить ГВК-1

Таблиця 1. Послідовності олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентних зондів

№	Назва	5'-3' послідовність	ДНК-мішень
1	EHV1-F	cct-agg-atg-aac-gct-ctt-tta-atg	Ген gpH ВГК-1 (nt 2335-2399) AY665713
2	EHV1-R	gac-gcg-aag-gcg-gac-at	
3	EHV1-P	FAM-tcc-caa-cgg-aac-ggt-gac-gc-BHQ1	
4	EHV2-F	cgc-cca-tct-cta-ttg-gca-taa	Ген gpH ВГК-2 (nt 1841-1912) EH- VU20824
5	EHV2-R	cgg-ccg-aga-caa-aca-tct-tt	
6	EHV2-P	JOE-atg-agg-tcc-gtg-aca-cct-tta-tag-aga-BHQ1	

Таблиця 2. Результати ПЛР-РЧ аналізу зразків відмитих лімфоцитів на ГВК-1 та 2 типу

№ зразку	Граничний цикл Ct			Інтерпретація
	ГВК-1	ГВК-2	Ендогенний контроль	
7	38	-	30	сумнівний
60	36,5	-	28	позитивний ГВК-1
82	-	-	НД*	негативний
85	-	-	НД	негативний
102	-	-	НД	негативний
105	37,5	-	НД	позитивний ГВК-1
119	38	-	НД	сумнівний
125	35,5	-	30	позитивний ГВК-1
142	-	-	НД	негативний
139	-	-	НД	негативний
pPRP**			15	ендогенний контроль

* – не досліджували (НД).

** – pPRP плазмідна ДНК з клонованим геном PRP, 10^8 копій.

типу. Нажаль, виявити ГВК-2 типу в зразках культуральної рідини не вдалося. На наш погляд, пошук інших ДНК-мішеней ГВК-2 можливо надасть змогу ідентифікувати цей вірус в культурі клітин. Підібрані оптимальні параметри проведення ПЛР-РЧ для визначення ГВК-1 типу та провели ПЛР аналіз 10 зразків відмитих лімфоцитів (табл. 2).

Позитивними на ГВК-1 виявилися проби № 60, 105, 125. Дуже високі значення граничного циклу для цих проб Ct 35,5–37,5 вказують про

низьку концентрацію вірусу в лімфоцитах, або низьку концентрацію самих лімфоцитів (табл. 2). Для контролю якості виділеної ДНК введено використання ендогенного контролю (консервативний ген PRP). Граничне значення ендогенного контролю варіює Ct 28–30, що вказує на низьку концентрацію відмитих лімфоцитів, взятих для аналізу (див. табл. 2). Цим же можна пояснити високі дані граничного циклу при виявленні ГВК-1.

Проведено порівняння результатів

Таблиця 3. Показники дослідження коней в РЗГА, РДП та ПЛР

№ п/п	Проба №	ГВК-1			ГВК-2	
		РЗГА	РДП	ПЛР	РДП	ПЛР
1	142	1:64	+	-	++	-
2	105	1:64	+	+	++	-
3	119	1:32	+	+	+	-
4	125	1:8	-	+	++	-
5	7	1:8	-	+	-	+
6	139	1:32	+	+	+	-
7	85	1:32	-	-	-	-
8	82	0*	-	-	+	-
9	102	0	-	-	++	-
10	60	1:32	+	+	-	-

Примітка – 0* – антитіла відсутні

діагностичних тестів РЗГА, РДП та ПЛР (табл. 3).

Проби № 2, 3, 6 та 10 позитивно реагують в РДП та ПЛР, щодо ГВК-1. Из 5 проб, позитивних в РДП – 4 виявили позитивними в ПЛР, і з 5 проб, негативних в РДП – 3 проби були негативними в ПЛР (див. табл. 3). Тобто, отримані дані свідчать про співвідношення як позитивних, так і негативних проб між собою. В РДП та РЗГА виявлені приципітуючі та гемаглютинуючі антитіла, а в ПЛР – ДНК вірусу. Тому, у серонегативних тварин в РДП та РЗГА можуть бути ураження вірусом, який в лімфоцитах виявляємо за допомогою ПЛР, однак хвороба ще не розвинулась або ці тварини є толерантними щодо вірусу.

Деяка розбіжність між реакцією затримки гемаглютинації та реакцією дифузійної преципітації, на нашу думку, полягає в тому, що у інфікованих тварин процес утворення гемаглютинуючих та преципітуючих антитіл відбувається неодноразово. Також слід відмітити, що при дослідженні проб 8 та 9 всі три серологічні реакції дали негативний результат на наявність специфічних антитіл до ГВК-1.

Висновки.

1. Розроблено методику діагностики герпесвірусної інфекції коней першого типу в полімеразній ланцюговій реакції.

2. Результати лабораторних діагностичних тестів РЗГА та РДП при герпесвірусній інфекції коней 1 типу корелюють з результатами в ПЛР.

3. При лабораторній діагностиці герпесвірусної інфекції коней першого типу титри 1:32, що отримані в реакції затримки гемаглютинації, дають в одному випадку позитивний, а в іншому негативний результат в реакції дифузійної преципітації, що, вірогідніше за все, спричинено неодноразовим процесом утворення гемаглютинуючих та преципітуючих антитіл.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому потрібно вдосконалювати розроблений метод ПЛР для діагностики герпесвірусної інфекції коней першого типу, а також розробити даний діагностичний тест для діагностики герпесвірусної інфекції коней другого типу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Старчеус А. П. Вірусні хвороби коней / А. П. Старчеус, А. Ф. Ображей. – К. – 1999. – 112 с.
2. Галатюк О. Є. Заразні хвороби коней / О. Є. Галатюк. – Житомир: Видавництво “Волинь”. – 2003. – 280 с.
3. Юров К. П. Инфекционные аборт у кобыл и их профилактика / К. П. Юров. – М.: ИД “Грааль”. – 2003 – 50 с.
4. Лабораторна діагностика хвороб коней / В. А. Синицин, М. В. Пекний, В. А. Євтушенко [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – Вип. 22, – С. 549–552.
5. Неволько О. М. Особливості діагностики інфекційних захворювань / О. М. Неволько, А. О. Меженський, В. С. Свідерський // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – Вип. 24. – С.124–131.
6. Меженський А. О. Технічні аспекти лабораторної діагностики заразних хвороб коней в Україні / А. О. Меженський // Наук.-техн. бюл. / Ін-т біології тварин Нац. акад. аграр. наук України. – 2013. – Вип. 14, № 3–4. – С. 314–320.
7. Діагностика герпесвірусної інфекції першого та другого типу у коней: методичні рекомендації / О. Є. Галатюк, В. Л. Бегас, А. І. Каньовський [та ін.] – Житомир – 2009. – 22 с.

REFERENCES

- Starcheus, A. P. & Obrazhej, A. F. (1999). *Virusni hvorobi konej*. Kyiv, Ukrayina. 112 s. [in Russian].
- Halatyuk, O. Ye. (2003). *Zarazni khvoroby konej*. Zhytomyr, Ukrayina, Vydavnytstvo “Volyn”, 280 s. [in Ukrainian].
- Jurov, K. P. (2003). *Infekcionnye aborty u kobyly i ih profilaktika*. Moscom, Russia: ID “Graal”, 50. [in Russian].
- Mezhens'kyy, A. O. (2013). *Tekhnichni aspekty laboratornoyi diahnostryky zaraznykh khvorob konej v Ukrayini*. *Nauk.-tekhn. byul. / In-t biolohiyi tvaryn Nats. akad. ahrar. nauk Ukrayiny*, V. 14 (3–4), 314–320. [in Ukrainian].
- Halatyuk, O. Ye., Behas V. L., Kan'ovs'kyy, A. I. et al. (2009) *Diahnostryka herpesvirusnoyi infektsiyi pershoho ta druhooho typu u konej: metodychni rekomendatsiyi*. Zhytomyr, Ukrayina, 22 s. [in Ukrainian].

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЛОШАДЕЙ ПЕРВОГО ТИПА

Радыховский Н. Л., Бегас В. Л., Никитин О. А.

Житомирский национальный агроэкологический университет, г. Житомир

Разработана методика постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени для диагностики

герпесвирусной инфекции лошадей первого типа и проведено ее сравнение с другими диагностическими тестами. Мы выбрали оптимальные параметры проведения полимеразной цепной реакции для выявления герпесвируса лошадей 1 типа. Сравнение результатов диагностических тестов: реакции задержки гемагглютинации, реакции диффузионной преципитации и полимеразной цепной реакции, показало совпадение как положительных, так и отрицательных проб между собой. Некоторое расхождение в результатах реакции задержки гемагглютинации и реакции диффузионной преципитации заключается в неодновременном образовании гемагглютинирующих и преципитирующих антител.

Ключевые слова: герпесвирус второго типа, герпесвирусные инфекции, герпесвирус первого типа, лошади, ринопневмония, полимеразная цепная реакция.

THE POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE LABORATORY DIAGNOSTICS OF THE FIRST TYPE HERPESVIRUS INFECTION OF THE HORSES

N. Radsikhovskii, V. Behas, O. Nikitin

Zhytomyr National Agroecological University

In Ukraine there is a shortage of domestic, industrial made available diagnostic kits for diagnosis of herpesvirus infections of horses. Some interest is also a comparative assessment of available diagnostic tests for herpes infections of horses. The aim of our research was to develop a method of setting polymerase chain reaction in real time to diagnose herpes infections of horses first type and compare the results obtained with polymerase chain reaction results obtained by other diagnostic tests: haemagglutination inhibition test, agar gel immunodiffusion test. Setting response haemagglutination inhibition test and agar gel immunodiffusion test was carried out in accordance with the guidelines "Diagnosis of herpes infection first and second type of horses." The development of polymerase chain reaction in real time spent at the Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine.

The nucleotide sequence of primers and fluorescent probes to identify horses herpesvirus 1 and 2 types chosen using the program Primer Express (Applied Biosystems). Oligonucleotide primers and fluorescent probes were synthesized amiditophosphit method for automatic DNA synthesizer ABI 3400 (Applied Biosystems). An analysis of nucleotide sequences was found that the most conservative gene in horses herpesvirus types 1 and 2 is a gene encoding the glycoprotein H. We picked the optimal parameters of the polymerase chain reaction to determine the first horse herpesvirus type and analyzed 10 samples of washed lymphocytes. Very high values of limit cycle for these tests Ct 35,5–37,5 indicates a low concentration of the virus in lymphocytes or very low concentration of lymphocytes. We also conducted comparing the results obtained in the haemagglutination inhibition test, agar gel immunodiffusion test and polymerase chain reaction. The data indicate a match both positive and negative samples together. Therefore, seronegative animals in agar gel immunodiffusion test and haemagglutination inhibition test can defeat the virus, which in lymphocytes detected by polymerase chain reaction, but not yet developed the disease or those animals are tolerant about the virus. Some of the difference between the response haemagglutination inhibition test and agar gel immunodiffusion test, in our opinion, is that the formation of the infected animals haemagglutinating and precipitating antibodies occurs simultaneously.

Keywords: horses, herpesvirus infections, rhinopneumonia, herpesvirus first type, herpesvirus second type, polymerase chain reaction.
