

# Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 636.09:579.62:579.88:  
001.891:577.231  
© 2010

*А.М. Головка,  
академік УАН*

*Українська академія  
аграрних наук*

*В.О. Постоєнко,  
доктор сільсько-  
господарських наук*

*Н.В. Гаврасьєва*

*В.В. Кацімон*

*М.С. Карпуленко*

*Державний науково-  
контрольний інститут  
біотехнології і штамів  
мікроорганізмів*

## **РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОГО НАБОРУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПЛР**

*Розроблено та перевірено аналітичні  
характеристики діагностичного набору з  
використанням методу полімеразної ланцюгової  
реакції для виявлення вірусу репродуктивно-  
респіраторного синдрому свиней, а саме:  
чутливість, відтворюваність, специфічність.*

Виявлення й ідентифікація збудника інфекційних чи інвазійних хвороб є важливою проблемою практичної ветеринарної медицини. Для її розв'язання запропоновано великий арсенал методичних прийомів, починаючи від класичних методів і закінчуючи імунологічними й молекулярно-біологічними [1, 2].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) вважають одним із найдосконаліших діагностичних методів, що дає змогу виявити поодинокі клітини збудника інфекційної чи інвазійної хвороби, а також контролювати ефективність лікування [1, 3].

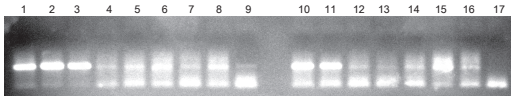
Вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (РРСС) вражає тварин усіх порід, включаючи чистопородні, племінні, кросбредні. РРСС характеризується пізніми абортами (90—109 днів супоросності), передчасними родами (110—112 днів), прохолостами свиноматок, народженням мертвих, муміфікованих, нежиттєздатних поросят, загибеллю новонароджених і ураженням органів дихання у поросят-сисунів [4, 5]. Епізоотична ситуація щодо цієї проблеми в Україні залишається недостатньо вивченою, а профілактичні та оздоровчі заходи недосконалі через відсутність чітко визначеної системи діагностичних і специфічних методів лікування й профілактики інфекції з використан-

ням вітчизняних діагностичних наборів [6]. Діагностика РРСС базується на епізоотологічних, клінічних, патологоанатомічних даних і результатах лабораторних досліджень з виявлення специфічних антитіл у крові перехворілих тварин за допомогою реакції нейтралізації, непрямой реакції імунофлюоресценції, імуноферментного аналізу, а також з ізоляції й ідентифікації збудника методом ПЛР [7, 8].

Молекулярно-генетичні методи діагностики інфекційних хвороб, зокрема й ПЛР, нині є найчутливішими. Аналіз базується на визначенні у досліджуваному матеріалі специфічних для цього збудника нуклеотидних послідовностей його геному [9, 10, 11]. Нами раніше було розроблено, синтезовано праймери до вірусу РРСС та підібрано оптимальні умови стадії ампліфікації ПЛР [2].

**Мета роботи** — розробка та вивчення аналітичних характеристик діагностичного набору для виявлення РРСС за допомогою ПЛР.

**Матеріали і методи.** Для виділення РНК використовували набір «РНК-сорб» (ЦНДІ епідеміології, МОЗ РФ, Москва), в основі якого лежить метод сорбції на силікагелі [11], з наступною реакцією зворотної транскрипції. Отриману комплементарну ДНК (кДНК) використовували



**Рис. 1. Електрофореграма результатів перевірки ПЛР-аналізу на чутливість: розведення референс-вірусу Hasse: 1 —  $10^{-1}$ ; 2 —  $10^{-2}$ ; 3 —  $10^{-3}$ ; 4 —  $10^{-4}$ ; 5 —  $10^{-5}$ ; 6 —  $10^{-6}$ ; 7 —  $10^{-7}$ ; 8 —  $10^{-8}$ ; 9 —  $10^{-9}$ ; розведення референс-вірусу Lelystad: 10 —  $10^{-1}$ ; 11 —  $10^{-2}$ ; 12 —  $10^{-3}$ ; 13 —  $10^{-4}$ ; 14 —  $10^{-5}$ ; 15 —  $10^{-6}$ ; 16 —  $10^{-7}$ ; 17 — культура клітин Marc-145**

у ПЛР, яку проводили на 4-канальному ампліфікаторі «Терцик» виробництва НВФ «ДНК-Технологія» (Росія, Москва). До реакційної суміші об'ємом 25 мкл входило: трис-НСІ (рН 8,8) — 67 ммоль;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 16,6 мМ;  $\text{MgCl}_2$  — 2 ммоль; твін-20 — 0,01%; дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ — по 100 мкмоль; кожного із специфічних праймерів — 50 пмоль; Taq-полімерази — 2 од.; зразків виділеної ДНК — 5 мкл. Для попередження випаровування на поверхню реакційної суміші кожного зразку нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікація становила 35 циклів. Кожний цикл включав денатурацію ДНК при  $95^\circ\text{C}$  — 45 с, відпал праймерів при  $58^\circ\text{C}$  — 30 с, синтез компліментарних ланцюгів при  $74^\circ\text{C}$  — 40 с (в останньому циклі цю стадію було подовжено до 5 хв). Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5%-му агарозному гелі (забарвленому бромідом етидію) з використанням трисборатного буфера при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявності (або відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Чутливість розробленого набору визначали методом 10-разового розведення культуральних референс-вірусів РРСС (європейського типу Lelystad) і референс-вірусу (американського типу Hasse). Титр вірусу

Lelystad  $3,5 \text{ Ig ТЦД}50/\text{см}^3$  і Hasse —  $4,5 \text{ Ig ТЦД}50/\text{см}^3$ . Відтворюваність досліджували у 3-х повторях позитивних зразків до вірусу РРСС.

Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали його положенням (розміром) щодо фрагментів стандартних маркерів. Для визначення специфічності досліджували штами гетерологічних збудників, зразки патологічного матеріалу від клінічно хворих тварин, референс-віруси РРСС (європейський Lelystad і американський Hasse типи вірусу) (таблиця).

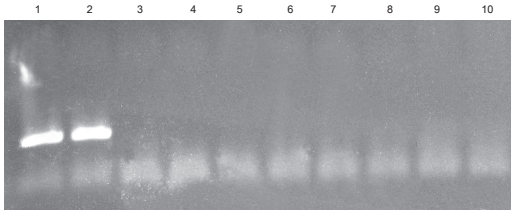
**Результати досліджень.** Ключовим етапом у створенні високоспецифічного методу ПЛР-діагностики хвороб є вибір послідовностей для олігонуклеотидних праймерів. Раніше ми вже наводили розроблені 2 пари праймерів з урахуванням європейського та американського геному вірусу (PRRSF2 і PRRSR2; PRRSF3 і PRRSR3) та отримали оптимальні параметри ампліфікації відпалу праймерів при  $58^\circ\text{C}$  [2].

Чутливість розробленого набору визначали методом 10-разового розведення референс-вірусів Lelystad та Hasse. Титр вірусу Lelystad  $3,5 \text{ Ig ТЦД}50/\text{см}^3$  і Hasse —  $4,5 \text{ Ig ТЦД}50/\text{см}^3$ . У досліджуваних діапазонах розведення вірусу Lelystad від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ , для вірусу Hasse від  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  виявлено продукти ампліфікації. Чіткі специфічні смужки на транслюмінаторі були на рівні вірусу Lelystad у розведенні вірусу  $10^{-2}$ , а вірусу Hasse —  $10^{-3}$ . Ledь помітні смужки — в інших розведеннях референс-вірусів РРСС (рис. 1). Отримані результати свідчать про високу чутливість розробленого діагностичного набору. Для визначення відтворюваності брали 5 позитивних проб і досліджували їх у 3-х повторях. В усіх 3-х повторях інтенсивність світіння та довжина ампліфікованого ПЛР-продукту були однаковими та виявлялися на рівні позитивного контролю.

Специфічність визначали використовуючи зразки штамів вірусів і бактерій, які отримали з Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ (див. таблицю, рис. 2). Проаналізо-

**Дослідження специфічності діагностичного набору «ПЛР-РРСС»**

Номер	Зразок	Результат
1	Референс-вірус РРСС Lelystad	Позитивний
2	Референс-вірус РРСС Hasse	»
3	Вірус КЧС шт. «К»	Негативний
4	Вірус хвороби Ауескі шт. «Арський»	»
5	Ентеровірус	»
6	Збудник мікоплазми ( <i>Mycoplasma hyorhynchiae</i> )	»
7	Збудник сальмонельозу ( <i>Salmonella suis</i> )	»
8	Культура Marc-145	»
9	Патологічний матеріал (легені) від свині з підозрою на РРСС	»
10	М'ясо від клінічно здорової свині	»



**Рис. 2. Електрофореграма результатів перевірки ПЛР-аналізу на специфічність: 1 — референс-вірус Lelystad; 2 — референс-вірус Hasse; 3 — вірус КЧС шт. «К»; 4 — вірус хвороби Ауескі шт. «Арський»; 5 — ентеровірус; 6 — збудник мікоплазми (*Mycoplasma hyopneumoniae*); 7 — збудник сальмонельозу (*Salmonella suis*); 8 — культура Marc-145; 9 — патологічний матеріал (легені) з клінічними ознаками РССС; 10 — м'ясо від клінічно здорової свині**

вано: штами референс-вірусів РССС (європейський Lelystad і американський Hasse типи вірусу), отримані з Національного ветеринарного науково-дослідного інституту (м. Пулава, Польща) та депоновані в ДНКІБШМ; гетеровидові штами бактерій: *Salmonella suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, а також штами вірусів чуми свиней, Ауескі, ентеровірусу; патологічний матеріал.

Вибір цих зразків зумовлений тим, що перебіг РССС досить часто відбувається в асоціації з іншими хворобами та має подібні клінічні ознаки з обраними вірусами.

Характерний продукт ампліфікації виявлено у позитивних пробах (референс-вірусів РССС) № 1, 2 (див. рис. 2). При цьому у пробах № 3—10, що відповідають гетеровидовим штамам і патологічному матеріалу, продукт ампліфікації відсутній, що свідчить про високу специфічність розробленого набору.

## Висновки

Розроблено та вивчено аналітичні характеристики діагностичного набору для виявлення вірусу РССС.

У досліджуваних діапазонах розведення вірусу Lelystad від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ , для вірусу Hasse від  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  виявлено продукти ампліфікації, що свідчить про високу чутливість

розробленого набору. Доведено високу специфічність діагностичного набору для виявлення вірусу РССС. Запропонований діагностичний набір рекомендується використовувати для лабораторної діагностики вірусу РССС у відповідних закладах ветеринарної медицини.

## Бібліографія

1. Гинсбург А.Л., Романова Ю.М. ПЦР в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний//Клиническая лабораторная диагностика. — 1998. — № 2. — С. 35—39.
2. Головки А.М., Гаврасьєва Н.В., Постоецько В.О. та ін. Розробка праймерів для детекції вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней полімеразною ланцюговою реакцією//Наук.-техн. бюлетень. — 2009. — №10. — С.146—151.
3. Boom R., Sol C.J. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids//J. Clin. Microbiol. — 1990. — V.28. — P. 495—503.
4. Halbur P.G., Paul P.S., Frey M.L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X.J., Andrews J.J., Lum M.A., Rathje J.A. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus// Vet. Pathol. — 1996. — V. 33. — P. 159—170.
5. Kapur V., Elam M.R., Pawlovich T.M., Murtaugh M.P. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States//J. Gen. Virol. — 1996. — V. 77. — P.1271—1276.
6. Key K.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Swenson S.L., Toth T.E., Meng X.J. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates//Vet. Microbiol. — 2001. — V. 83. — P. 249—263.
7. Meng X.-J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development//Vet. Microbiol. — 2000. — V. 74. — P. 309—329.
8. Meng X.-J., Paul P.S., Halbur P.G. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus//J. Gen. Virol. — 1994. V. 75. — P. 1795—1801.
9. Murtaugh M.P., Elam M.R., Kakach, L.T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus//Arch. Virol. — 1995. — V. 140. — P. 1451—1460.
10. Pirzadah B., Gagnon C.A., Dea S. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein//Can. J. Vet. Res. — 1998. — V. 62. — P.170—177.
11. Saiki R., Gillensten U., Erlich H. Genome analyses//Ed. K.E. Davies. — New York, 1990. — P. 176—190.