

**О. А. ГОЛОВКО**, аспірант  
**В. В. КАЦИМОН**  
**М. С. КАРПУЛЕНКО**, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

## ВИПРОБУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСОБУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНОМУ ВІРУСУ ЧУМИ М'ЯСОЇДНИХ

У статті відображено результати роботи щодо розроблення чутливої та специфічної тест-системи для ідентифікації геному вірусу чуми м'ясоїдних. Послідовно описано методи отримання специфічних праймерів, режими постановки зворотно-транскрипційної полімеразної реакції та результати дослідження чутливості специфічності розробленої діагностичної тест-системи.

*Ключові слова:* геном вірусу, діагностика, тест-система, чума м'ясоїдних

Під чумою собак розуміють поширене в усьому світі висококонтагіозне, гарячкове, системне захворювання, викликане інфекційним вірусом чуми собак (canine distemper virus, CDV). Широкий спектр ураження вірусу охоплює не тільки собак, але й інших хижаків. Вірус чуми собак належить до роду *Morbillivirus* підродини *Paramyxovirinae* сімейства *Paramyxoviridae*. Сімейство *Paramyxoviridae* разом з родинами *Bornaviridae*, *Filoviridae* і *Rhabdoviridae* належить до порядку *Mononegavirales*. До сімейства *Paramyxoviridae* по Принглу [1] належать обидві підродини *Paramyxoviridae* (з родами *Morbillivirus*, *Paramyxovirus*, *Rubulavirus*) і *Pneumovirinae* (з родом *Pneumovirus*) [2].

До Морбіллівірусів відноситься крім вірусу чуми собак також: патогенний для людини вірус кору (measles virus MV), вірус чуми великої рогатої худоби (RPV), збудник чуми дрібної рогатої худоби (Peste - des - petits - ruminants Virus, PPRV), також Морбіллівіруси морських ссавців (вірус чуми тюленів «phocine distemper virus», PDV); «porpoise morbillivirus», PMV і морбіллівірус дельфінів DMV [3].

Незважаючи на великі успіхи в боротьбі з чумою м'ясоїдних, пов'язані з впровадженням засобів специфічної та симптоматичної терапії, поліпшенням контролю за носіями і переносниками збудника в природних вогнищах, немає впевненості в тому, що епізоотії чуми м'ясоїдних не повторюватимуться. Проблеми специфічної профілактики та своєчасної діагностики, саме тому як і раніше актуальні, проте для повного вирішення їх ще далеко. Як і раніше, немає єдиної думки про переваги тих чи інших вакцин, методах обліку ефективності щеплень, показаних до них і навіть про способи проведення імунізації [4]. Також гостро стоїть й проблема діагностики [5]. Не всі методи сучасної діагностики можуть служити в якості чутливої і специфічної системи для виявлення інфекції вірусу чуми собак у живих тварин. Одними з найбільш високочутливих лабораторних методів діагностики, на сьогоднішній день по праву можна вважати, молекулярно - генетичні методи діагностики інфекційних хвороб, в тому числі і полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

ПЛР базується на визначенні у досліджуваному матеріалі специфічних для даного збудника нуклеотидних послідовностей його геному [6, 7].

**Мета роботи:** розробити діагностичну тест-систему ПЛР для ідентифікації геному вірусу чуми м'ясоїдних в біологічному матеріалі різного походження.

### Матеріали і методи:

При розробці специфічних праймерів для виявлення вірусу *Canine Distemper Virus* (CDV) на основі ПЛР використовували бази даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей), PDB sequences.

За літературними даними було визначено декілька маркерних послідовностей: «highly conserved region of the NP gene of the Ond-CDV strain» та «consensus sequence of 55 gene N», що придатні для розробки специфічних праймерів, з яких для подальшої роботи було обрано ділянку «highly conserved region of the NP gene» (GenBank: AJ009656) РНК вірусу CDV.

Потім ми провели пошук нуклеотидних послідовностей «conserved region of the nucleocapsid protein N gene» РНК вірусу CDV для наступного аналізу їх варіабельності, та пошуку консервативних ділянок, необхідних для визначення праймерів. Використовуючи комп'ютерну програму «Vector NTI» та «PerIPrimer» було розроблено декілька пар праймерів, з яких було обрано одну пару CDV F5 (прямий праймер) та CDV R6 (зворотний праймер) і за допомогою Інтернету (програма BLAST) перевірено їх специфічність. Критичної гомології з нуклеотидними послідовностями інших груп бактерій, вірусів або еукаріот виявлено не було.

ПЛР проводили на чотирьох каналному ампліфікаторі "Терцик" виробництва НВФ "ДНК-технологі" (Росія, м. Москва). Реакційна суміш 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 50 пмоль кожного із специфічних праймерів, 2 од. Таq-полімерази, 5 мкл зразків виділеної кДНК. Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші напаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікація складалась з 35 циклів. Кожний цикл ампліфікації включав денатурацію кДНК при 95°C –45 секунд, відпал праймерів при 58°C, – 30 секунд, синтез комплементарних ланцюгів при 74°C – 40 секунд (в останньому циклі цю стадію було подовжено до 5 хвилин). Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі (забарвленому бромідом етидію) з використанням трис-боратного буфера при градієнті напрути 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на трансілюмінаторі під УФ-світлом по наявності (чи відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів нуклеїнової кислоти певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента нуклеїнової кислоти визначали його положенням (розміром) по відношенню до фрагментів стандартних маркерів.

### Результати досліджень:

Ключовим етапом у створенні високоспецифічного метода ПЛР-діагностики для виявлення вірусу *Canine Distemper Virus* (CDV) (як і при створенні інших систем ПЛР-діагностики) є вибір послідовностей для олігонуклеотидних праймерів. Цей етап базується на попередньому вивченні літературних джерел, даних Інтернету і подальшій безпосередній розробці пари олігонуклеотидних праймерів за допомогою спеціальних комп'ютерних програм. Пара олігонуклеотидів повинна відповідати певним вимогам ([http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)):

- ❖ мати високу специфічність для зв'язування зі строго визначеними ділянками геному збудника;
- ❖ мати схожу температуру відпалу й константу зв'язування з нуклеїновою кислотою при певних умовах ПЛР;
- ❖ не створювати жорстких вторинних структур;
- ❖ не бути комплементарними один до одного.

Було синтезовано 3 пари олігонуклеотидних праймерів, серед яких (для контролю праймерів власної розробки) статейні - CDV F1 і CDV R2 [8]; CDV F3 і CDV R4 [9] та власної розробки - CDV F5 і CDV R6 (таблиця 1). Синтез праймерів на наше замовлення виконано у НВФ "Літех" (Росія, м. Москва).

Таблиця 1.

Позначення та характеристики олігонуклеотидних праймерів

№ пп	Назва	Послідовність (5' → 3')	Р-р фрагменту, н.з.	Маркерна послідовність
1	CDV F1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	287	highly conserved region of the NP gene of the Ond-CDV strain
2	CDV R2	CAAGATAACCATGTACGGTGC		
3	CDV F3	TTCTGAGGCAGATGAGTTCTTC	829	conserved segment of CDV N gene (Onderstepoort)
4	CDV R4	CTTGGATGCTATTTCTGACACT		
5	CDV_F5	AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG	827	nucleocapsid protein N gene
6	CDV_R6	GACACTAGCTGAGCCTCTTCC		

Перевірку праймерів спершу проводили за темп. відпалу – 55° С і 60° С (рисунок 1). За результатами проведених досліджень встановлено задовільні властивості розробленої пари праймерів – CDV F5 і CDV R6. Робочою температурою відпалу праймерів було обрано 58° С.

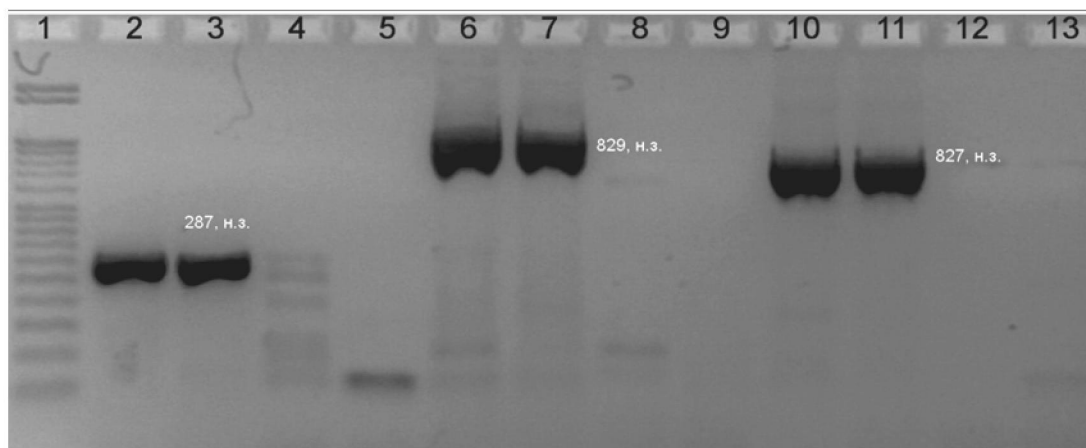


Рис. 1. Електрофореграма результатів ПЛР за різних температур відпалу (н.з. – нуклеотидних залишка)

1 – маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bp DNA Ladder), 2 - 5 праймери *CDV F1* і *CDV R2*; 6-9 праймери *CDV F3* і *CDV R4*; 10-13 праймери *CDV F5* і *CDV R6*.

2,6,10 - ПКЗ (Tm=55°С, *Virus febris contagiosae canis* (штам CDVU 39) мин. 10<sup>4.2</sup> TCID<sub>50</sub>); 3,7,11 - ПКЗ (Tm=60°С, *Virus febris contagiosae canis* (штам CDVU 39) мин. 10<sup>4.2</sup> TCID<sub>50</sub>); 4,8,12 – НКЗ, сироватка крові, Tm=55°С;

5,9,13 – фізрозчин.

Чутливість тест-системи визначали на розведенні титру *Virus febris contagiosae canis* (рисунок 2).

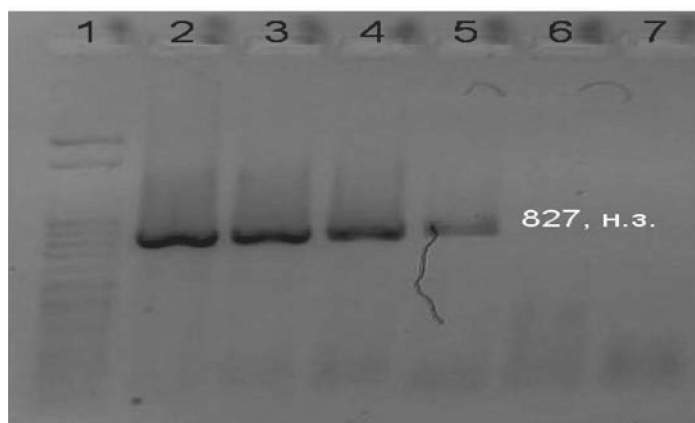


Рис. 2. Електрофореграма результатів ПЛР за визначення чутливості

1 – маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bp DNA Ladder); 2 - *Virus febris contagiosae canis* 10<sup>4.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 3 - *Virus febris contagiosae canis* 10<sup>3.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 4 - *Virus febris contagiosae canis* 10<sup>2.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 5 - *Virus febris contagiosae canis* 10<sup>1.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 6 - *Virus febris contagiosae canis* 10<sup>0.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 7– негативний контроль.

Також було перевірено температуру відпалу на патологічному матеріалі (дані не наведені).

Проведено порівняння специфічності розробленої пари праймерів з комерційною ПЛІР тест-системою «Полічум» (виробник «Амплісенс», Росія) та серологічної тест-системою «СІТО TEST CDV Ag». Результати дослідження наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати порівняння різних методів виявлення CDV

№ п/п	Назва вакцинного препарату	Штам в складі препарату	CDV F5 CDV R6	ПОЛІЧУМ	СІТО TEST CDV Ag
1	Biocan PPUPY – D	CDVU 39	+	+	+
2	Biocan PPUPY	CDVU 39	+	+	-
3	Biocan DHPPI	(не вказано)	+	+	-
4	Мультикан-4	Штам № 37	+	+	+
5	Мультикан-8	(не вказано)	+	+	+
6	Nobivac Puppy	Onderstepoort	+	+	+
7	Nobivac DHPPI	Onderstepoort	+	+	+
8	Duramune Max 5 CvK4L	Onderstepoort	+	+	
9	Vanguard plus 5L	Snyder Hill	+	-	
10	Розчинник для вакцин «Біо-Тест-Лаб»	НКЗ	-	-	

#### Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. У результаті виконаної роботи розроблено праймери для детекції чуми м'ясоїдних на основі полімеразної ланцюгової реакції.
2. Оптимальна температура відпалу складає 58°C.
3. Розроблена тест-система володіє високою чутливістю, яка становить  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> *Virus febris contagiosae canis*.
4. Проведено порівняння розробленої тест-системи з ПЛІР тест-системою «Полічум» (виробник «Амплісенс», Росія) та серологічної тест-системою «СІТО TEST CDV Ag» за результатами якої вона, принаймні, не поступається комерційним тест-системам.
5. На даний час проводиться подальша перевірка розробленої тест-системи на патологічному матеріалі, а також розробка нормативної документації з метою реєстрації тест-системи в Україні.

#### Список використаної літератури:

1. Pringle, C. R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. - Archives of Virology - Volume 144, Issue 10, - p. 2065-2070. - Print ISSN 0304-8608
2. Інфекційні хвороби тварин / Б.Ф.Бессарабов, С.С. Воронін та ін; Під ред. А.А. Сидорчука. - М.: Колос, 2007. - 671 с. - ISBN 978-5-9532-0301-2.
3. Lamb, R. A., Kolakofsky, D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In Fields Virology, 2001 - pp.1305-1340. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. - DOI 10.1099/vir.0.81715-0
4. Мейер Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интрепритация и диагностика / Д. Мейер, Дж Харви // [перевод с английского]. - М: 2007. - 456 с. - ISBN 5-9668-0016-2
5. Михайлова М.В. Иммуномодулирующие действие интерферонов и иммуноглобулинов на гуморальный и клеточный иммунитет у собак при чуме плотоядных: Дис. канд. вет. наук: 16.00.04. - Троицк. 1999, - 175с. - УДК 619.616.98 578.831.2.
6. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. Scharf, J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. in: Science. 239.1988, 487—491. - ISSN 0036-8075.
7. PCR protocols / edited by John M.S. Bartlett, David Stirling. --2nd ed. p. cm. -- (Methods in molecular biology ; v. 226). Includes bibliographical references and index. Humana Press Inc. - Totowa, New Jersey, 2003. - ISBN 0-89603-642-1.
8. Frisk, A. L., König, M., et al. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1999. - pp. 3634-3643. - PMID: PMC85712.
9. Wang et al.. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in china. - Virology Journal, 2011, 8:85. - DOI: 10.1186/1743-422X-8-85.

#### ИСПЫТАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ /

Головко О. А., Кацимон В. В., Карпуленко М. С.

Целью работы было испытать диагностическую тест-систему ПЦР для идентификации генома вируса чумы плотоядных в биологическом материале разного происхождения.

При помощи компьютерных программ были подобраны специфические праймеры к консервативным участкам генома вируса чумы плотоядных. ПЦР проводили на чотирьох канальном амплификаторе. Амплифікація состояла из 35 циклов. Детекцию продуктов реакции проводили при помощи электрофореза у 1,5% агарозном геле. Результаты оценивали просмотром геля после электрофореза на трансиллюминаторе под УФ-светом по наличию или отсутствию красно-оранжевых фрагментов нуклеиновой кислоты определенного размера. Специфичность амплифицированного фрагмента определяли по его положению относительно фрагментов стандартных маркеров.

В ходе работы были синтезованы 3 пары олигонуклеотидных праймеров, среди которых статейные - CDV F1 и CDV R2 [8]; CDV F3 и CDV R4 [9], а также собственной разработки - CDV F5 и CDV R6. За результатами проведенных исследований установлено удовлетворительные свойства разработанной пары праймеров при температуре отжига 58°C. Чувствительность определяли на разведениях *Virus febris contagiosae canis*. Проведена валидация разработанной пары праймеров в сравнении с комерческой ПЦР тест-системой «Полічум» и серологической тест-системой «СІТО TEST CDV Ag». Праймеры оказались чувствительными и специфическими.

### **Выводы.**

1. Разработаны праймеры для детекции чумы плотоядных в основе полимеразной цепной реакции.
2. Оптимальная температура отжига составляет 58°C.
3. Разработанная тест-система обладает высокой чувствительностью, составляющей  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> *Virus febris contagiosae canis*.
4. Выполнено сравнение разработанной тест-системы с коммерческой ПЦР тест-системой ПЛР и серологической системой по результатам которого она, по крайней мере, не уступает коммерческим.

Ключевые слова: геном вируса, диагностика, тест-система, чума плотоядных

**TESTING THE EFFICIENCY MEANS FOR DETECTING VIRUS GENOME DISTEMPER** / Golovko O.A., Katsimon V.V., Karpulenko M.S.

*Objective: To develop a diagnostic test system for the identification of genomic PCR canine distemper virus in a biological material of different origin. Using computer programs were picked specific primers to conserved regions of the genome of canine distemper virus. PCR was performed on a thermocycler chotiroh channel. Detection of the reaction products was performed using elektroforeza 1.5% agarose gel. Results were evaluated after viewing the gel under elektroforez on a transilluminator with UV light for the presence or absence of red-orange nucleic acid fragments of a particular size. The specificity of the amplified fragment was determined by its position relative to a standard marker fragments.*

*Synthesized were 3 pairs of oligonucleotide primers of which article - CDV F1 and CDV R2 [ 8] ; CDV F3 and CDV R4 [ 9] , as well as their own development - CDV F5 i CDV R6. For the results of studies found satisfactory properties developed when the pair of primers the annealing temperature 58°C . Sensitivity was determined by dilution *Virus febris contagiosae canis*. Conducted validation developed primer pair in comparison with commercial PCR test system « Polichum » and serological test system «CITO TEST CDV Ag». Primers were sensitive and specific .*

### **Conclusions**

1. Primers were developed to detect canine distemper based polymerase chain reaction.
- 2 . Optimal annealing temperature makes 58°C.
- 3 . A test system has a high sensitivity, component  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> *Virus febris contagiosae canis*.
- 4 . Comparison of the developed test systems with commercial PCR test system and serological LHP system which resulted in it, at least not inferior to commercial.

Key words: virus genome, diagnostics, system test, distemper

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **О. О. Напшенко**

Рукопис надійшов 18.09.2014 року.