

М. А. САПАЧОВА¹В. О. ПОСТОЄНКО², доктор сільськогосподарських наукВ. М. ШАПОШНИК¹, кандидат ветеринарних наук¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна²Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ, Україна

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ СУБТИПУ H5N1

Наведено результати моніторингових досліджень на пташиний грип серед птиці різних видів: синантропної, дикої, зоопаркової, з приватного сектору та птахогосподарств за 2013 р. Проведено порівняльний аналіз результатів молекулярної детекції вірусу грипу птиці методами полімеразної ланцюгової реакції та ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот (RT – LAMP). 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, епізоотична ситуація, моніторингові дослідження, метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот.

Грип птиці – висококонтагіозне вірусне захворювання, яке характеризується високою смертністю (до 100 %) птиці. Етіологічний агент, що викликає дане захворювання - РНК-вмісний вірус, який відноситься до роду *Orthomyxoviridae*, родини *Influenzavirus*. Він є переважно сферичної форми, вібріони діаметром 80-120 нм, поліморфні. Вірус відноситься до типу А і має 16 підтипів за гемаглютинінами та 9 підтипів – за нейрамінідазою. Для птиці найбільш патогенними є підтипи H5 та H7[1,3,6].

В Україні діагностика грипу птиці проводиться комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних, патологоанатомічних змін та лабораторних досліджень.

Грип необхідно диференціювати від інших захворювань птиці таких, як ларинготрахеїт, хвороба Ньюкасла, пастерельоз та респіраторні захворювання[2,5].

Саме тому, до методу діагностики вірусу грипу птиці (ВГП) висувається ряд вимог за показниками специфічності, чутливості, відтворюваності та тривалості проведення аналізу[1, 2].

При лабораторній діагностиці особливе місце займає високочутливий метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Цей метод базується на ампліфікації специфічних ділянок геному певного типу збудника. Висока чутливість, специфічність та короткий час проведення аналізу роблять його перспективним при діагностиці ВГП. Але, на жаль, проведення ПЛР аналізу вимагає використання коштовного обладнання та реактивів і тому не завжди є доступним для лабораторій, що мають ресурсні обмеження [7, 8].

Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес-методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов. Одним із таких є новий підхід, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (LAMP). У комбінації зі зворотною транскрипцією, LAMP придатний для ампліфікації РНК – матриці (RT – LAMP) [9,10]. Нами раніше підбрано реакційну суміш та оптимізовано умови проведення реакції RT – LAMP для діагностики пташиного грипу субтипу H5N1 [4].

Метою даної роботи є апробація у моніторингових дослідженнях запропонованого нами методу RT – LAMP та проведення порівняльного аналізу чутливості і результатів виявлення вірусу грипу птиці методами полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ) та RT-LAMP.

Матеріали та методи досліджень. При проведенні порівняльного аналізу результатів детекції вірусу пташиного грипу субтипу H5N1 методами ПЛР-РЧ і RT-LAMP використовували експериментальні дані, отримані у Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи при дослідженні патологічного матеріалу від птиці, який надходив з усіх областей України згідно Державного плану моніторингу на 2013 рік.

При постановці ПЛР-РЧ використовували комерційні набори, як вітчизняних, так і закордонних виробників, а саме «Птах-Грип-ПЛР» (Укрзоветпромстач, Україна) та «Quageen» (США). Умови проведення реакції та параметри ампліфікації наведені у настановах до застосування наборів.

Умови RT-LAMP описані нами раніше. В роботі використано оптимальні температуру і час реакції -59°C та 60 хв[4].

Чутливість діагностичного набору «Птах-Грип-ПЛР» та запропонованого нами RT-LAMP визначали, досліджуючи кДНК референс-штаму вірусу пташиного грипу H5N1, який наданий ННЦ ІЕКВМ (м. Харків), в діапазоні концентрацій від 10,0 до 0,01 ng на пробу.

Результати досліджень. За 2013 рік нами досліджено 1943 проби матеріалу від птиці методами ПЛР-РЧ та RT-LAMP (табл.1).

Таблиця 1

Моніторинг вірусу пташиного грипу в Україні за 2013 р.

Вид матеріалу	Кількість проведених досліджень методом ПЛР-РЧ	Кількість проведених досліджень методом RT – LAMP
Патологічний матеріал від птиці	692	692
Трахеальні та клоачні змиви	33	33
Пісок	1	1
Послід від птиці	1217	1217
Всього	1943	1943

Моніторинг на пташиний грип проведено серед птиці різних видів: синантропної, дикої, зоопаркової, з приватного сектору та промислових птахогосподарств. Отримані експериментальні дані показують відсутність вірусу пташиного грипу у досліджуваних пробах. Також встановлено, що застосування обох методів молекулярної детекції ВГП, а саме, ПЛР-РЧ та RT-LAMP дає співставні

результати. Але практичне використання RT-LAMP порівняно з ПЛР-РЧ має ряд суттєвих переваг, таких як значне скорочення терміну виконання аналізу, можливість застосування даного підходу в польових умовах і відсутність коштовного обладнання. Разом з цим, однією із важливих характеристик того чи іншого методу є його чутливість.

Даний показник для ПЛР-РЧ визначали з використанням набору «Птах-Грип-ПЛР» (табл.2, рис.1).

Таблиця 2

Чутливість ПЛР-РЧ тест-системи «Птах-Грип-ПЛР»

Quantity cDNA, ng на пробу	Type	Cross threshold	
		FAM	JOE
10	Unknown	26,05	22,61
1	Unknown	30,73	26,78
1	Unknown	30,36	26,73
1	Unknown	30,26	26,66
0,1	Unknown	34,05	30,41
0,1	Unknown	34,99	30,40
0,1	Unknown	34,10	33,90
0,01	Unknown	43,37	33,90
0,01	Unknown	42,33	33,59
0,01	Unknown	36,68	33,52
-	негативний контроль	-	-
+	позитивний контроль	11,45	12,50

Основним критерієм оцінки отриманих результатів є визначення граничного циклу (Ст), що характеризує певну стадію ПЛР-РЧ, на якій спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції порівняно з фоновим рівнем. Під час використання діагностичного набору «Птах-Грип-ПЛР» рахувалися позитивними зразки, якщо значення Ст по каналу FAM або JOE менше чи дорівнює 40 ($St \leq 40$), що свідчить про наявність ампліфікації генів вірусу грипу фрагментів H5N1 відповідно. Встановлено, що чутливість ПЛР-РЧ набору «Птах-Грип-ПЛР» дорівнює 0,01 нг (FAM) і 0,1 нг (JOE) на пробу кДНК вірусу грипу птиці типу А субтипу H5N.

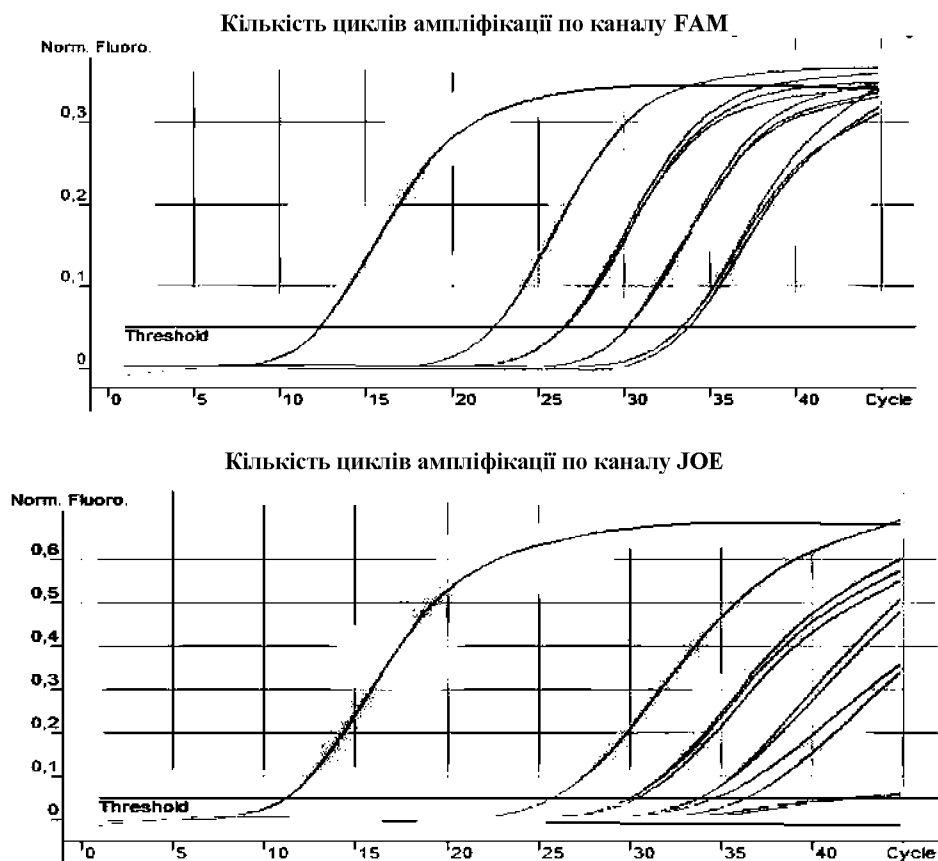


Рис. 1. Чутливість ПЛР-РЧ тест-системи «Птах-Грип-ПЛР»

Чутливість розробленого нами набору при проведенні дослідження методу RT-LAMP дорівнює 0,1 нг на пробу (рис.2).

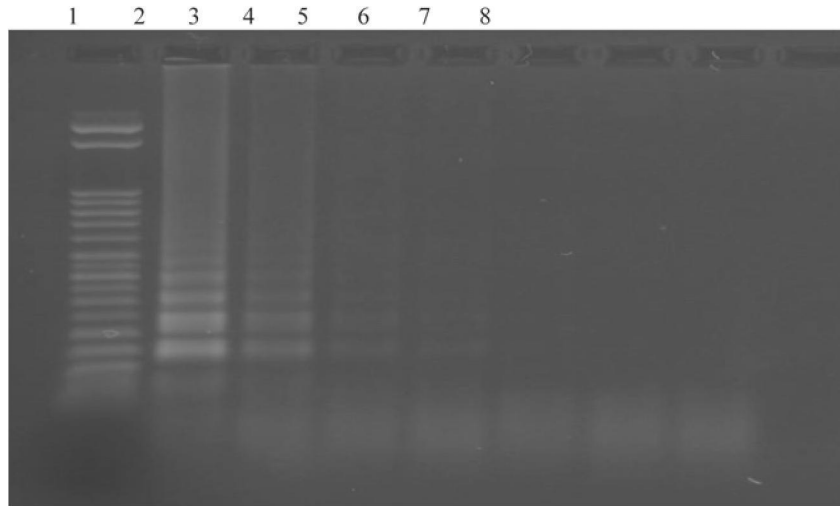


Рис.2 Електрофоретична детекція продуктів RT – LAMP, виконана з різними концентраціями кДНК вірусу грипу птиці (нг на пробу): 1 – маркер молекулярної ваги, 2 – 10,0, 3 – 5,0, 4 – 1,0, 5 – 0,1, 6-8 – 0,01

Дещо нижча чутливість RT-LAMP пояснюється тим, що в даному методі використовується візуальна детекція продуктів реакції. Проте, 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 [7].

Висновки:

1. Проведено моніторингові дослідження на пташиний грип серед птиці різних видів за 2013 р. Показано відсутність даного збудника на території України.
2. Порівняльним аналізом встановлено, що застосування обох методів молекулярної детекції ВГП, а саме, ПЛІР-РЧ та RT-LAMP дає співставні результати, що підтверджує перспективність використання останнього у діагностиці інфекційних захворювань тварин.
3. Доведено, що чутливість обох методів молекулярної детекції ВГП знаходиться на рівні 0,01 – 0,1 нг/пробу, що відповідає світовим вимогам.
4. Перспективність використання RT – LAMP в практиці ветеринарної медицини обґрунтовується отриманням ряду суттєвих переваг: короткий час проведення аналізу, можливість застосування даного підходу в польових умовах та відсутність коштального обладнання.

Список використаної літератури:

1. Диагностика інфекційних захворювань тварин: теорія і практика / В. А. Прискока, В. О. Загребельний, А. О. Меженський і др. – К., ДНДЛДВСЕ, 2014. – 454 с.
2. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие / А.Н. Головки, В.А. Упкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др; Под ред. А.Н. Головки. –Х.: «НТМТ», 2007.- 512 с.
3. Особоопасные болезни животных. Справочное пособие / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, А.С. Донченко, И.Ю. Хухоров, С. Ф. Терновая, А.В. Книзе. – Покров – Новосибирск, 2002.-184 с.
4. Постоенко В. О. Оптимізація умов проведення ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу пташиного грипу H5N1 / Постоенко В. О., Сорочинський Б. В., Сапачова М. А. //Наукове видання. Науково-технічний бюлетень. – Львів, 2013. – Вип. 14. – С. 325-330.
5. Практикум по ветеринарній вірусології. / Белоусова Р. В., Троценко Н. И., Преображенская Э. А. – М.: Колос, 2006.– 248 с.
6. Avian Influenza in Italy 1997-2001 / I. Capua, S. Marangon, M. dallaPozza [et al.] // AvianDis. – 2003. – Vol. 47. – P. 839-843.
7. Francesca Sidoti, Development of a Real – Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. / Francesca Sidoti, Francesca Rizzo, Cristina Costa and all // Mol.Biotechnol. – 2010. Vol 44:41 – 50, P.41 – 50.
8. Highly pathogenic avian influenza //Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / O. I.E. – 2009.
9. J. Ji Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop – mediate diso thermal amplification assay. / J. Ji, Q. M. Xie, C. Y. Chen and all // Pultr Science. – 2010. – Vol 89: 477, P. 477 – 483.
10. Shivakoti S., Ito H., Murase T., Ono E., Takakuwa H., Yamashiro T., Otsuki O. Development of reverse transcription – loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens // J. Vet. Med. Sci. – 2010. – Vol. 72. – P. 519 – 523.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦЫ СУБТИПА H5N1 / М. А. Сапачова, В. А. Постоенко, В. Н. Шапошник

Представлены результаты мониторинговых исследований на птичий грипп среди птицы разных видов: синантропной, дикой, зоопарковой, из частного сектора за 2013 г. Проведен сравнительный анализ результатов молекулярной детекции вируса гриппа птицы методами полимеразной цепной реакции и изотермической амплификации нуклеиновых кислот (RT – LAMP). Обосновано, что перспективным является внедрение в практику лабораторий ветеринарной медицины Украины RT – LAMP как экспресс-метода диагностики птичьего гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа птицы, диагностика, эпизоотическая ситуация, мониторинговые исследования, метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MOLECULAR DETECTIONS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 /
M. A. Sapachova, V. O. Postoienko, V.M. Shaposhnik

In the article we used experimental data, which was received in State research institute of laboratory diagnostics and veterinary and sanitary expertise during tests of pathological materials of birds. The pathological materials of birds were sent from all regions of Ukraine according to state plan of monitoring 2013. Results of tests for avian influenza in different kind of birds: synanthropic, wild, zoological, private sector and poultry farm are presented. Received experimental data indicate about absent avian influenza virus in tested samples.

Comparative analysis of results of molecular detection of avian influenza virus by polymerase chain reaction and reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT – LAMP) was carried out.

Usage of both methods gave comparable results. But practical usage of RT – LAMP, in comparison to PCR-RT, has important advantages, such as short time of analysis, possibility of using this method in field conditions and there is no necessity in expensive equipment.

It was established that sensitivity of PCR-RT kit «Пmax-Грип-ПДП» is 0,01 ng (FAM) and 0,1 ng (JOE) per sample of cDNA of avian influenza virus type A subtype H5N1. Sensitivity of developed by us RT-LAMP kit is 0,1 ng per sample. Somewhat lower sensitivity of RT-LAMP is because we used visual detection of products of reaction.

It is proved that implementation in practice of Ukrainian laboratory of veterinary medicine RT – LAMP, as express - method of diagnostics of avian influenza, is perspective.

Keywords: avian influenza virus, diagnostics, epizootic situation, monitoring investigation, the method of isothermal nucleic acid amplification.

Рецензент – доктор ветеринарних наук **В. В. Чумаченко**

Рукопис надійшов 14.08. 2014 р.