

УДК 619:616.927

DOI: 10.31073/vet\_biotech39-08

МУЗИКІНА Л.М., канд. вет. наук, e-mail: loramuzykina@i.ua,

МОЛОЖАНОВА А.В., e-mail: vetereneri@ukr.net,

СИДОРЕНКО Т.В., e-mail: t-sudorenko@ukr.net,

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net,

МЕЖЕНСЬКА Н.А., канд. вет. наук, доц., e-mail: nataamezh@gmail.com,

СИТЮК М.П., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: snp1978@ukr.net

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

## ВИДІЛЕННЯ ДНК ВІРУСУ АЧС РІЗНИМИ ТИПАМИ ВИДІЛЬНИХ НАБОРІВ ПРИ ДІАГНОСТИЦІ ТЕСТ-СИСТЕМОЮ «АЧС ПЛР-РЧ»

*У статті наведено результати ефективності виділення ДНК вірусу АЧС при використанні трьох типів видільних наборів, які найчастіше використовуються в діагностичних лабораторіях України.*

*Встановлено, що при використанні наборів сорбційного («ДНК-сорб-В») та преципітуючого типу («РИБО-преп») виділення ДНК відбулося в усіх 10 досліджуваних зразках в зазначених тест-системою параметрах. При використанні видільного набору колоночного типу («IndiSpin Pathogen Kit») у одному зразку із селезінки свині не пройшов контроль виділення, що могло бути спричинене занадто високими концентраціями нуклеїнових кислот. Необхідно враховувати рекомендації виробника видільного набору «IndiSpin Pathogen Kit», що передбачають зменшення кількості вихідного зразка селезінки при виділенні до 5–10 мг (використання 10% суспензії).*

**Ключові слова:** виділення ДНК, вірус АЧС, свині, селезінка, цільна кров, ПЛР.

**Вступ.** Африканська чума свиней (АЧС) – це висококонтагіозне вірусне захворювання свійських та диких свиней, що завдає величезних економічних збитків свинарству України. Засоби лікування та специфічної профілактики хвороби відсутні, тому визначальним фактором комплексу ветеринарно-санітарних заходів боротьби з епізоотією АЧС є швидка і своєчасна діагностика [1–4].

Науковцями ІВМ НААН було розроблено вітчизняну тест-систему для діагностики АЧС, яка була валідована в Україні та Німеччині. Тест-система зареєстрована ТОВ «Укрветпромполіс» як «Набір діагностичний «АЧС ПЛР-РЧ» для діагностики АЧС методом ПЛР у режимі реального часу», Реєстраційне посвідчення № ВВ-00870-06-18 від 27.04.2018 р. [5].

Набір використовується для проведення діагностичних та моніторингових досліджень щодо АЧС серед домашніх та диких свиней державними

лабораторіями ветеринарної медицини України та науково-дослідними установами.

Процес виділення нуклеїнової кислоти є принципово важливим етапом для молекулярно-генетичних досліджень (ПЛР, секвенування, рестрикційний аналіз, молекулярна гібридизація тощо) [6, 7]. Для тестування всі ці методи вимагають отримання нуклеїнових кислот з високим ступенем очищення та мінімальним рівнем деградації їх молекул [8].

При постановці полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для діагностики АЧС ключову роль відіграє етап підготовки проб та виділення ДНК. Для виявлення ДНК цього вірусу використовують клінічний (цільна кров) та патолого-анатомічний матеріал (тканини та органи), які можуть містити у великій кількості продукти аутолізу тканин, ферментів, які є інгібіторами ПЛР [9].

**Мета роботи:** встановити ефективність виділення ДНК вірусу АЧС різними типами видільних наборів (сорбційного, преципітуючого та колоночного типу) при використанні тест-системи «АЧС ПЛР-РЧ».

**Матеріали та методи дослідження.** В якості досліджуваного матеріалу використовували 5 зразків селезінок свиней, що містили вірус АЧС, та 5 зразків сироваток крові свиней, негативних щодо АЧС.

Для ампліфікації використовували «Набір діагностичний «АЧС ПЛР-РЧ» для діагностики АЧС методом ПЛР у режимі реального часу», серія 020819.

Для виділення нуклеїнових кислот зі зразків матеріалів від свиней нами використано три типи видільних наборів, а саме:

1. Комплект реагентів «ДНК-сорб-В», кат. № K1-2-100, «АмплиСенс», (призначений для виділення ДНК методом афінної сорбції на частинках силікагелю з клінічного матеріалу);

2. Комплект реагентів «РИБО-преп», кат. № K2-9-Et-100, «АмплиСенс», (призначений для виділення тотальної РНК/ДНК методом преципітації на частинках силікагелю з клінічного матеріалу);

3. «IndiSpin Pathogen Kit», кат. № 54104, INDICAL BIOSCIENCE (призначений для виділення РНК/ДНК вірусів і ДНК бактерій з цільної крові, сироватки крові, плазми крові, інших фізіологічних рідин, а також мазків, змивів та зразків тканин тваринного походження використовуючи швидку процедуру спін-колонки).

Підготовку досліджуваного матеріалу до аналізу проводили згідно листівки-вкладки до набору «АЧС ПЛР-РЧ». Для стабілізованої консервантом Na-EDTA крові попередня підготовка не застосовується.

Проби селезінок ретельно розтирали в фарфорових ступках, додаючи рівний об'єм фізіологічного розчину та перемішували. Суміш відстоювали за кімнатної температури протягом 30 хвилин, після чого переносили в пробірку

на 1,5 см<sup>3</sup> (типу «Eppendorf») та центрифугували 1 хв. за 10 тис. об/хв. Для дослідження використовували 0,1 см<sup>3</sup> надосадової рідини.

Виділення ДНК проводили трьома видільними системами, згідно інструкцій виробника. Для контролю виділення ДНК з досліджуваного матеріалу використовували внутрішній контрольний зразок (ВКЗ) з діагностичного набору «АЧС ПЛР-РЧ», який додавали в кількості 10 мкл на етапі лізису до підготовлених досліджуваних зразків.

Реакційну суміш готували, змішуючи 19,75 мкл реактиву «ПЛР-суміш» та 0,25 мкл реактиву «Taq ДНК-полімераза» (у розрахунку на одну пробу). Виділену ДНК дослідних зразків і контролів тест-системи – ПКЗ АЧС та НКЗ додавали по 5,0 мкл. Ампліфікацію проводили за допомогою ампліфікатору Rotor-Gene Q (Quagen, Німеччина). Параметри циклювання зазначені в табл. 1.

Таблиця 1

### Параметри циклювання тест-системою «АЧС ПЛР-РЧ»

№ з/п	Етапи	Температура, °С	Час	Кількість циклів
1	Початкова денатурація ДНК	95	10 хв	1
2	Денатурація ДНК	95	15 с	45
	Відпалювання праймерів	58*	60 с	

**Примітка:** \* Флуоресценцію вимірювали при 58 °С на каналах FAM/Green (ДНК вірусу АЧС) та JOE/Yellow (ВКЗ).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Дослідження проводились в лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН, що акредитована НААУ згідно вимог ДСТУ ISO/IEC 17025:2019.

З метою контролю постановки реакції проводили оцінку результатів контролів діагностичного набору «АЧС ПЛР-РЧ». Результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення Ct по каналу FAM ПКЗ АЧС менше або дорівнює 35 ( $Ct \leq 35$ ), відсутнє значення Ct НКЗ та значення Ct по каналу JOE усіх досліджуваних зразків (ампліфікація ВКЗ) менше або дорівнює 35 ( $Ct \leq 35$ ).

В таблиці 2 представлені результати контрольних точок етапів ПЛР-РЧ. Отримані результати аналізу контрольних точок етапів ПЛР (екстракції та ампліфікації) відповідають очікуваним значенням і задовольняють вимоги листівки-вкладки до набору діагностичного «АЧС ПЛР-РЧ».

Таблиця 2

**Оцінка результатів аналізу контрольних точок етапів ПЛР-РЧ**

Контролі	Етап аналізу	Значення Ct по каналу FAM – ДНК вірусу АЧС		Значення Ct по каналу JOE – контроль ВКЗ	
		Очікуваний результат	Отриманий результат	Очікуваний результат	Отриманий результат
ВКЗ (В-)	екстракція	відсутнє	відсутнє	≤35	24,51/23,37/24,69
НКЗ (К-)	ампліф-я	відсутнє	відсутнє	відсутнє	відсутнє
ПКЗ (К+)	ампліф-я	≤35	25,06/25,23/25,17	відсутнє	відсутнє

Наступним етапом був аналіз результатів виділення досліджуваних зразків.

Результати отриманих значень Ct по каналу JOE представлені в таблиці 3, де Ct1 – це значення, отримані при використанні комплекту реагентів «ДНК-сорб-В», Ct2 – комплекту реагентів «РИБО-преп», Ct3 – «IndiSpin Pathogen Kit».

Таблиця 3

**Значення Ct по каналу JOE**

№	Найменування	Вид	Ct 1	Ct 2	Ct 3
1	К+	Positive Control	-	-	-
2	К-	Negative Control	-	-	-
3	В-	NTC	24,51	23,37	24,69
4	1 селезінка	Unknown	25,64	24,62	26,12
5	1 кров	Unknown	27,19	26,51	27,87
6	2 селезінка	Unknown	26,48	25,28	26,91
7	2 кров	Unknown	26,49	25,25	27,09
8	3 селезінка	Unknown	25,35	24,98	25,85
9	3 кров	Unknown	26,13	25,36	26,72
10	4 селезінка	Unknown	27,40	26,69	27,95
11	4 кров	Unknown	28,89	27,70	29,54
12	5 селезінка	Unknown	27,24	26,98	-
13	5 кров	Unknown	27,61	26,63	28,22

В результаті аналізу даних щодо контролю виділення встановлено, що один зразок селезінки не пройшов контроль виділення при використанні видільного набору «IndiSpin Pathogen Kit».

Досліджуваний зразок вважали позитивним щодо виявлення ДНК вірусу АЧС, якщо значення Ct по каналу FAM було менше або дорівнювало 40 ( $Ct \leq 40$ ). Це свідчило про ампліфікацію гену, що кодує специфічну ділянку

вірусу АЧС. Зразок вважали негативним, якщо значення Ct по каналу FAM було відсутнє, але значення Ct по каналу JOE (ампліфікації ВКЗ) – менше або дорівнювало 35 ( $Ct \leq 35$ ).

В таблиці 4 представлені результати отриманих значень Ct по каналу FAM.

Таблиця 4

## Значення Ct по каналу FAM

№	Найменування	Вид	Ct 1	Ct 2	Ct 3
1	K+	Positive Control	25,06	25,23	25,17
2	K-	Negative Control	-	-	-
3	B-	NTC	-	-	-
4	1 селезінка	Unknown	15,24	16,52	14,18
5	1 кров	Unknown	-	-	-
6	2 селезінка	Unknown	16,41	17,38	15,97
7	2 кров	Unknown	-	-	-
8	3 селезінка	Unknown	15,53	16,66	15,09
9	3 кров	Unknown	-	-	-
10	4 селезінка	Unknown	17,67	16,95	15,77
11	4 кров	Unknown	-	-	-
12	5 селезінка	Unknown	14,41	15,83	13,36
13	5 кров	Unknown	-	-	-

В результаті аналізу отриманих даних встановлено, що всі завідомо позитивні зразки селезінки свиней мали значення Ct по каналу FAM, а в завідомо негативних зразках сироватки крові свиней значення Ct по каналу FAM були відсутні.

Згідно вимог листівки вкладки до тест-системи «АЧС ПЛР-РЧ» результати аналізу не враховуються при відсутності ампліфікації внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ) в досліджуваних зразках по каналу JOE і потребують повторного дослідження, починаючи з етапу виділення.

Такі випадки можливі при наявності інгібіторів у досліджуваному зразку, а також при роботі зі зразками з дуже високим вмістом нуклеїнових кислот господаря (наприклад, зразками певних типів тканин, таких як тканини селезінки, або зразками крові з високим вмістом клітин).

Згідно рекомендацій виробника набору «IndiSpin Pathogen Kit», для виділення нуклеїнових кислот зі зразків крові рекомендується використовувати по 50–200 мкл на кожен зразок. Як правило, при роботі з більшістю зразків крові можна використовувати 200 мкл. Однак значно підвищений вміст клітин на тлі запальних або неопластичних захворювань може призводити до сильного

збільшення вмісту в зразку нуклеїнових кислот господаря. У таких випадках зменшення вхідного обсягу зразка до 50 мкл може допомогти поліпшити результати наступних процедур аналізу [9].

При роботі зі зразками тканин за використання набору «IndiSpin Pathogen Kit», механічне або ферментативне руйнування структури тканини є необхідною умовою для вивільнення клітин, подальшого вивільнення нуклеїнових кислот, а також проходження матеріалу через мембрану. Різні типи тканин можуть варіюватися в широких межах щодо текстури і жорсткості, типів клітин, а також вмісту нуклеїнових кислот господаря і інгібуючих речовин. Крім того, ефективність локалізації нуклеїнових кислот патогену в тканині може варіюватися в залежності від типу тканини, патогену і стадії інфекційного ураження. В якості вихідного зразка можна використовувати до 25 мг свіжої або замороженої тканини, а при роботі з тканинами з дуже високим вмістом клітин на одиницю маси, наприклад тканинами селезінки, слід використовувати меншу кількість вихідного матеріалу (5–10 мг) [9].

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** За результатами проведених досліджень встановлено, що при використанні наборів «ДНК-сорб-В» та «РИБО-преп» виділення ДНК відбулося в усіх 10 досліджуваних зразках в зазначених тест-системою параметрах. При використанні видільного набору «IndiSpin Pathogen Kit» у одному зразку із селезінки свині не пройшов контроль виділення, що могло бути спричинене занадто високими концентраціями нуклеїнових кислот. Необхідно враховувати рекомендації виробника видільного набору «IndiSpin Pathogen Kit», що передбачають зменшення кількості вихідного зразка селезінки при виділенні до 5–10 мг, або використання 10% суспензії селезінки на фізіологічному розчині для виділення ДНК вірусу АЧС.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Діагностичні схеми використання лабораторних методів при африканській чумі свиней / О.М. Неволько, М.І. Сушко, М.А. Сапачова [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – № 25. – 2014. – С. 67–70.
2. Аналіз епізоотичної ситуації з африканської чуми свиней в Україні за 2012–2016 рр. / М.П. Ситюк, Г.А. Коваленко, І.В. Галка [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2016. – Вип. 29. – С. 241–248.
3. African swine fever: a global view of the current challenge / C. Gallardo, A.T. Reoyo, J. Fernández-Pinero [et al.] // Porcine Health Management. – 2015. – 14 p. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>.
4. African swine fever. OIE Terrestrial Manual. – Paris:OIE, 2008. – P. 1069–1082.
5. Патент на корисну модель № 126884. Спосіб виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу. Власник: ІВМ НААН. Номер заявки: № u 201800823; Дата подання заявки: 30.01.2018; Публікація відомостей про видачу: 10.07.2018. – Бюл. № 13.

6. Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification / I.G. Wilson // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63(10). – P. 3741–3751.
7. Akshara G. Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites / G. Akshara // Tropical Plant Research. – 2018. – Vol. 5(1). – P. 8–13. <https://doi.org/10.22271/tpr.2018.v5.i1.002>.
8. Ali N. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics / N. Ali, R. Rampazzo, A. Costa, M.A. Krieger // Bio-Med Research International. – 2017. – 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>.
9. IndiSpin Pathogen Kit – Handbook / Generon / HB-0934-EN-003. – 30 p. Mode of excess: [https://www.generon.it/import/Importazione/Documenti/INDICAL\\_Indispin\\_PI\\_EN.pdf](https://www.generon.it/import/Importazione/Documenti/INDICAL_Indispin_PI_EN.pdf). – Title from the screen.

**ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА АЧС РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ВЫДЕЛИТЕЛЬНЫХ НАБОРОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ «АЧС ПЦР-РЧ» / Музыкина Л.Н., Моложанова А.В., Сидоренко Т.В., Тарасов А.А., Меженская Н.А., Сытюк Н.П.**

*В статье приведены результаты эффективности выделения ДНК вируса АЧС при использовании трех типов выделительных наборов, которые чаще всего используются в диагностических лабораториях Украины.*

*Установлено, что при использовании наборов сорбционного («ДНК-сорб-В») и преципитирующего типа («РИБО-преп») выделение ДНК прошло во всех 10 исследуемых образцах в указанных тест-системой параметрах. При использовании выделительного набора колоночного типа («IndiSpin Pathogen Kit») в одном образце из селезенки свиньи не прошел контроль выделения, что могло быть вызвано слишком высокими концентрациями нуклеиновых кислот. Необходимо учитывать рекомендации производителя выделительного набора «IndiSpin Pathogen Kit», предусматривающие уменьшение количества исходного образца селезенки при выделении до 5-10 мг (использование 10% суспензии).*

**Ключевые слова:** выделение ДНК, вирус АЧС, свиньи, селезенка, цельная кровь, ПЦР.

**ASF VIRUS DNA ISOLATION USING DIFFERENT KITS FOR NUCLEIC ACID ISOLATION IN CASE OF “ASF PCR-RT” TEST KIT APPLICATION / Muzykina L.M., Molozhanova A.V., Sydorenko T.V., Tarasov O.A., Mezhenka N.A., Sytiuk M.P.**

**Introduction.** African swine fever (ASF) is a highly contagious viral disease of domestic and wild pigs that causes huge economic loss to Ukrainian pig production. There are no treatment and specific prevention of the disease, so the determining factor of the veterinary and sanitary measures to control ASF is rapid in time diagnostic approaches. The stage of sample preparation and DNA isolation is important in the polymerase chain reaction (PCR) test for African swine fever diagnostics.

**The goal of the work.** To establish the efficiency of ASF virus DNA isolation by sorption, precipitating and column isolation kits for ASF PCR- RT diagnostic test.

**Materials and methods.** ASF virus-containing pig spleens (5 samples) of and ASF-negative blood of pigs (5 samples) were used for test validation. For amplification “Diagnostic kit ASF PCR-RT for the diagnosis of African swine fever by real-time PCR” was used. Three nucleic acid

extraction kit: “DNA-sorb-B”, “RIBO-prep”, “IndiSpin Pathogen Kit” were used to obtain nucleic acids from the samples.

**Results of research and discussion.** According to the results of the research, it was established that nucleic acid extraction kits “DNA-sorb-B” and “RIBO-prep” allowed to get enough DNA for 10 tested samples according to concentration specified by the test kit, but “IndiSpin Pathogen Kit” failed for one positive porcine spleen sample, which could be due to high concentration of nucleic acid in sample.

**Conclusion and prospects for future research.** It is necessary to apply the recommendations of the manufacturer of the nucleic acid extraction kit “IndiSpin Pathogen Kit”, which recommend to use 10 fold dilution of the spleen samples for DNA isolation not more than 5-10 mg of sample.

**Keywords:** DNA isolation, ASF virus, pigs, spleen, whole blood, PCR.

## REFERENCES

1. Nevolko, O.M., Sushko, M.I., Sapachova, M.A., Marushchak, L.V., & Piatenko, S.O. (2014). Diagnostychny shemy vykorystannia laboratornih metodiv pry afrykanskyi chumy swiney [Diagnostic schemes of laboratory methods using for African swine fever]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary Biotechnology*, 25, 67-70 [in Ukrainian].
  2. Sytiuk, M.P., Kovalenko, H.A., Halka, I.V., Mandyhra, S.S., Nychyk, S.A., Mandyhra, M.S., & Bashchenko, M.I. (2016). Analiz epizootychnoi situatsii z afrykanskoï chumy svynei v Ukraini za 2012-2016 rr. [Epizootic analysis of african swine fever in Ukraine in 2012–2016] / *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary Biotechnology*, 29, 241-248. [in Ukrainian].
  3. Gallardo, M.C., Reoyo, A.T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, M.J., & Arias, M.L. (2015). African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management*, 1, 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>.
  4. *African swine fever. OIE Terrestrial Manual*. (2008). Paris: OIE.
  5. IVM NAAS. (2018). Sposib vyivlennia DNK virusu afrykanskoï chumy svynei metodom polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii u rezhymi realnoho chasu: patent na korysnu model [Method of detecting African swine fever virus DNA by real-time polymerase chain reaction: utility model patent] (No 126884). *Ukrpatent* [in Ukrainian].
  6. Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(10), 3741-3751.
  7. Akshara, G. (2018). Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites. *Tropical Plant Research*, 5(1), 8-13. <https://doi.org/10.22271/tpr.2018.v5.i1.002>.
  8. Ali, N., Rampazzo, R., Costa, A., & Krieger, M.A. (2017). Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Bio-Med Research International*, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>.
- IndiSpin Pathogen Kit Generon. HB-0934-EN-003. Retrieved from [https://www.generon.it/import/Importazione/Documenti/INDICAL\\_Indispi PI\\_EN.pdf](https://www.generon.it/import/Importazione/Documenti/INDICAL_Indispi PI_EN.pdf).