УДК 619:616.578.2:988.21

М.А. ГОЛОВКО, аспірант
М.В. БАБКІН, канд. вет. наук
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ
О.М. ДЕРЯБІН, зав. лабораторії
Інститут ветеринарної медицини НААН України, Київ

РОЗРОБЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ СКАЗУ НА ОСНОВІ ЗВОРОТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ЗТ-ПЛР)

Розроблено діагностичну тест-систему для виявлення й ідентифікації вірусу сказу на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР).

Нині проблема сказу набула великого соціального й економічного значення через епізоотію цього небезпечного гострого інфекційного захворювання природного та міського типу.

Серед патогенів, які завдають чималих збитків, сказ посідає одне з перших місць. Викликає захворювання етіологічний агент – РНК-вмісний вірус, який належить до роду *Lyssavirus* родини *Rhabdoviridae* порядку *Mononegavirales*. Геном вірусу представлений несегментованою односпіральною РНК завдовжки 12 кілобаз, що кодує п'ять структурних білків: нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну РНК-полімеразу (L). Геном вірусу містить кілька некодуючих регіонів, у т. ч. «псевдоген» GL (Ψ-регіон). Для молекулярної детекції й ідентифікації вірусу сказу найчастіше в ролі мішені обирають ген нуклеопротеїну або глікопротеїну. Вірус високонейротропний, смертельний для ссавців, у т. ч. людини.

Актуальність досліджень полягає насамперед у розробленні високоспецифічної (враховуючи існування різних генотипів) і чутливої тест-системи для проведення швидкої прижиттєвої й постмортальної діагностики сказу.

Незважаючи на поліпшення епізоотичної ситуації зі сказом у Європі, на території України кількість випадків цього небезпечного захворювання за останні роки значно зросла. З метою встановлення й аналізу причин зростання напруженості епізоотичної ситуації слід вести постійний моніторинг (виявлення, ідентифікація й типування) вуличних ізолятів вірусу сказу з використанням різних методів діагностики (МФА, біопроба, ІФА, ЗТ-ПЛР).

Вивчення збудника сказу та його діагностика мають велике значення, оскільки це захворювання може завдати чималих збитків. Високий рівень контагіозності й смертності тварин при захворюванні на сказ зумовлює потребу в розробленні й застосуванні експрес-методів діагностики з метою якомога швидшої ідентифікації збудника .

Мета роботи – розробити діагностичну тест систему на основі ЗТ-ПЛР для виявлення й ідентифікації вірусу сказу в біологічному матеріалі різного походження та об'єктах навколишнього середовища.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Враховуючи актуальність проблеми сказу, важливо отримати тест-систему високої чутливості. З цією метою було розроблено «гніздовий» варіант постановки ПЛР. Для уникнення заміни нуклеотидних часток ізолятів було обрано ген нуклеопротеїн, а саме більш консервативну ділянку гена, ближчу до 5' кінця. Для порівняння було використано дві різні пари праймерів Est1, Est2 і 509, 304. Позиції всіх праймерів наведено на рис. 1.

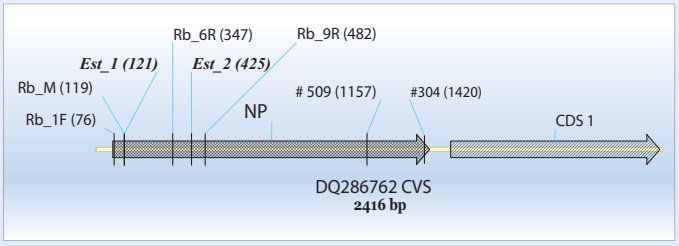

Рис. 1. Позиція праймерів на послідовності гена нуклеопротеїну штаму CVS вірусу сказу

У роботі використовували: референтний штам вірусу сказу CVS, 3 вакцинних штами (Щолково-51К, ТС-80, РБ-71) з національної колекції штамів ДНКІБШМ, 94 позитивні в реакції імунофлуоресценції зразки патматеріалу від 12 видів тварин і польові ізоляти, перевірені біопробою в лабораторії сказу ІВМ НААН (Л.П. Гришок). Як негативний контроль було взято зразки від неінфікованих тварин та штами вірусів представників різних родин (рис. 2).

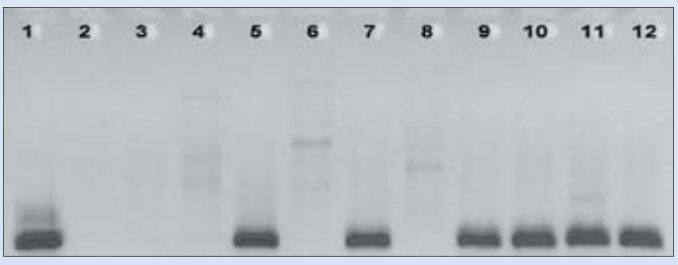

Рис. 2. 1 – референтний штам вірусу сказу CVS, 2 – референтний штам ВВГС «DH4p101», 3 – кажан (10B399), 4 – собака (10D848), 5 – лисиця (09F94), 6 – лисиця (09F209), 7 – борсук (09B136), 8 – кіт, 9 – собака (09D84),10 – Щолково-51К, 11 – ТС-80, 12 – РБ-71

© М.А. Головко, М.В. Бабкін, О.М. Дерябін, 2013

Виділення загальної РНК зі зразків, реакцію зворотної транскрипції та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконали за допомогою комерційних наборів «Рибозоль-А», «РЕВЕРТА-L» та «АмплиСенс 200-1» (Росія).

Для проведення ЗТ-ПЛР було використано такі пари праймерів, специфічні до гена нуклеопротеїну:

Est1 – 5'-GAAGCCTGAGATTATCGTGG-3' та Est2 – 5'-CCCTTCTACATCAGTACG-3', які обмежують фрагмент 5'-кінцевої ділянки гена нуклеопротеїну вірусу сказу; #304 – 5'-GAGTCACTCGAATATGTC-3' та #509 – 5'-GAGAAAGAACTTCAAGA-3', які обмежують 3'-кінцеву частину гена нуклеопротеїну, та оригінальні олігонуклеотидні праймери для «гніздового» варіанта ЗТ-ПЛР. Для проведення першої реакції «гніздового» варіанта ЗТ-ПЛР використали праймери Rb-1F – 5'-TGCCGACAAGATTGTATTC-3' і Rb-9R – 5'-ATGCTCAGGGACAGTGG-3' для першої реакції та «вироджені» Rb-MF – 5'-TTGAAGCCTGARATTATMGT-3' і Rb-6R – 5'-ATAGCTGGTCCAGTCTTCCG-3' (R = A/G, M = A/C) – для другої. Термопрофіль реакції:

– цикл для денатурації за t 95 °С – 4 хв;
– 35 циклів ампліфікації:
  денатурація за t 94 °С – 30 с;
  відпал праймерів за t 60 °С – 30 с;
  елонгація за t 72 °С – 30 с;
– заключний цикл елонгації за t 72° С – до 7 хв.

Конструювали й підбирали праймери, використовуючи пакет програм «Vector NTI Advanced 10» (Invitrogen, США), за допомогою якого було здійснено вирівнювання й аналіз доступних у GenBank нуклеотидних послідовностей геномів штамів та ізолятів вірусу сказу всіх генотипів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередній молекулярно-генетичний аналіз гена нуклеопротеїну вуличного вірусу сказу, який циркулює в Україні, виявив: хоча вірус належить до генотипу I, водночас спостерігається розподіл популяції на два молекулярні кластери.

Праймери Rb-MF і Rb-6R специфічні для консервативної ділянки гена нуклеопротеїну (N) вірусу сказу й забезпечують синтез фрагмента ДНК розміром 231 н. з. (рис. 3).

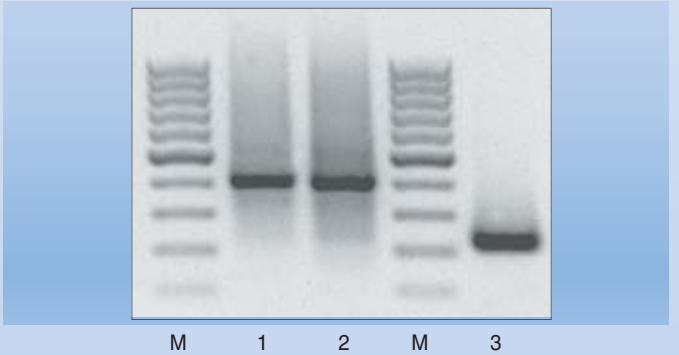

Рис. 3. M – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas);
1–2 – штам вірусу сказу CVS з першою парою праймерів (зовнішньою) Rb-9R – Rb-1F;
3 – штам вірусу сказу CVS з другою парою праймерів (внутрішньою) Rb-MF – Rb-6R

Виродженість другої пари олігонуклеотидних праймерів підвищує специфічність реакції, оскільки враховує відмінності нуклеотидного складу гена нуклеопротеїну вірусу сказу в різних генотипів.

Тест-система «RABIES-ТЕСТ» дає можливість проводити постмортальну діагностику на виявлення вірусу сказу завдяки його розпізнаванню в слині та крові хворих на сказ тварин.

Оскільки ці праймери не враховують відмінностей між генотипами, було розраховано праймери до консервативної ділянки гена нуклеопротеїну з урахуванням усіх існуючих генотипів, проте основний акцент зроблено на генотипі I, поширеному в Україні.

ВИСНОВКИ

Розроблена діагностична тест-система високоспецифічна й чутлива для виявлення й ідентифікації вірусу сказу. Дає змогу виявляти геномну РНК вірусу сказу в матеріалі різного походження (патологічний, культуральний, гомогенати).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Головко М.А.** Роль і місце молекулярно-біологічних методів при діагностиці сказу / М.А. Головко // Ветеринарна медицина [міжвід. темат. наук. зб.]. – Харків, 2009. – № 92. – С. 135–137.
2. **Патент** на корисну модель № 52924 (Україна): Спосіб виявлення РНК вірусу сказу за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції / О.М. Дерябін, М.А. Головко, М.В. Бабкін, В.О. Ушкалов; заявник і власник – ДНКІБШМ. – Заявл. 29.04.2010; опубл. 10.09.2010, Бюл. № 17.
3. **David D.** Antemortem detection and virus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996–1997 / D. David, C.E. Rupprecht, J.S. Smith, Y. Stram // Israel Journal Of Veterinary Medicine. – 1999. – Vol. 54 (3). – P. 20–32.
4. **Jackson A.** Rabies / A. Jackson, W. Wunner. – Ontario, 2007. – P. 680.
5. **Kulonen K.** Differentiation of two rabies strains in Estonia with reference to recent finnish isolates / K. Kulonen, I. Boldina // Jour. of Wildlife Diseases. – 1993. – Vol. 29 (2). – P. 209–213.

Одержано 25.12.2012

Разработка диагностической тест-системы для выявления и идентификации вируса бешенства на основе обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). *М.А. Головко, М.В. Бабкин, О.Н. Дерябин*

Разработана диагностическая тест-система для выявления и идентификации вируса бешенства на основе обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Development of diagnostic test kits for the detection and identification of rabies virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *M.A. Golovko, M.V. Babkin, O.M. Deryabin*

Developed a diagnostic test system for the detection and identification of rabies virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). ○