

**ОСОБЛИВОСТІ ПРИЖИТТЄВОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

Іщенко Л.М., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д., Мартиненко Д.Л.
Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, м. Київ.

Абрамов А.В., Король Д.М.

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

Розроблено nested ПЛР аналіз для виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ у зразках крові. Підібрано праймери та флуоресцентні зонди, специфічні для провірусної ДНК та внутрішнього контролю (фрагмент гену PRP, ВРХ). Проведено оцінку придатності методу. Показано, що запропонований метод є більш чутливим у порівнянні з одностадійною ПЛР та дозволяє виявляти на 23 % більше інфікованих тварин.

На сьогоднішній день, незважаючи на превентивні заходи щодо ліквідації лейкозу ВРХ, проблема поширення інфекції залишається надзвичайно актуальною. Збудником захворювання є РНК-вмісний вірус родини *Retroviridae*. Особливістю патогенезу лейкозу ВРХ є інтродукція кДНК вірусу в геном лімфоцитів інфікованої тварини. Саме така стадія патогенезу вірусу зумовлює латентний перебіг захворювання. При цьому, інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного геному (провірус) здатна передаватися дочірнім клітинам як складова частина генетичного матеріалу [8]. Саме у цей період інфіковані тварини є джерелом поширення збудника серед здорового поголів'я ВРХ, унаслідок проведення ветеринарно-зоотехнічних маніпуляцій. Виявити провірус лейкозу можна тільки за допомогою молекулярно-генетичних методів діагностики, зокрема, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [1, 3, 6]. Чисельними дослідженнями показана ефективність використання ПЛР у комплексі із серологічними методами для діагностики лейкозу ВРХ. Це, насамперед, стосується таких груп тварин як телята віком до 6 місяців, тільні корови та корови після отелу [4, 5, 8, 10].

Однак, використання ПЛР для діагностики лейкозу ВРХ в Україні носить стихійний характер, існує багато суперечливих даних щодо ефективності використання даного методу [2]. Частково це пояснюється консервативними переконаннями про перевагу серологічних методів, частково – відсутністю чітких інструкції щодо використання ПЛР. Згідно з рекомендаціями МЕБ діагностику лейкозу методом ПЛР потрібно проводити в модифікації nested, яка передбачає використання двох стадій ПЛР, що збільшує чутливість методу [9]. Однак, проаналізувавши діагностичні тест-системи, які сьогодні представлені на ринку, ми не знайшли відповідного аналогу.

Метою нашої роботи було розробити nested ПЛР для виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ та дослідити чутливість даного методу порівняно з одностадійною ПЛР.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили у відділі молекулярно-діагностичних досліджень УЛЯБП АПК, а також, у відділі імунологічних та моніторингових досліджень ДНДІЛД ВСЕ.

Матеріалом дослідження були кров ВРХ різного віку, відібрана з яремної вени в одноразові вакуумні пробірки типу VACUETTE, які містять стабілізатор крові Na-ЕДТА. Геному ДНК з цільної крові виділяли загальноприйнятим методом [11].

Нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів було підібрано з використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). TaqMan® зонд для детекції фрагменту провірусної ДНК лейкозу мічений флуоресцентним барвником FAM (6-карбоксіфлуоресцин), а для детекції внутрішнього контролю – JOE (εfip 6-карбоксі-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцин-N-гідроксисуццинімід).

Першу стадію ампліфікації проводили в термоциклері 2720 (Applied Biosystems) з наступним температурним профілем: активація урацил-ДНК-глікозилази – 10 хв

за температури 50°C, інактивація урацил-ДНК-глікозилази – 10 хв за температури 94°C; наступні 5 циклів передбачали активацію полімерази, які включали денатурацію (30 с за температури 95°C), відпалювання праймерів (30 с за температури 53°C), елонгацію (1 хв за температури 72°C) та 15 циклів реакції ампліфікації, які включали денатурацію (30 с за температури 95°C), відпалювання праймерів (30 хв за температури 58°C) та елонгацію (1 хв за температури 72°C).

Другу стадію ампліфікації здійснювали в режимі реального часу на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) з наступним температурним профілем: активація урацил-ДНК-глікозилази – 5 хв за температури 50°C, активація ДНК полімерази – 9 хв за температури 94°C, та 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію (15 с за температури 95°C), відпалювання праймерів (1 хв за температури 60°C) та елонгацію (30 с за температури 72°C).

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3.

Оцінка придатності методу (валідація) проводилась згідно зі стандартною схемою з використанням посібника СІТАС/EURACHEM [7].

Результати досліджень Відомо, що nested ПЛР характеризується вищою чутливістю порівняно з одностадійною ПЛР, однак ця перевага вимагає дуже суворого дотримання умов попередження контамінації зразків продуктами ампліфікації та отримання псевдопозитивних результатів [10]. У зв'язку з цим, нами було запропоновано проводити другу стадію ампліфікації в режимі реального часу, яка не вимагає проведення електрофорезу продуктів реакції. Окрім того ПЛР у реальному часі дає можливість проводити мультиплексний аналіз, що дозволяє контролювати якість та кількість виділеної ДНК і попереджати отримання псевдонегативних результатів з використанням іншого каналу детекції флуоресценції (рис. 1).

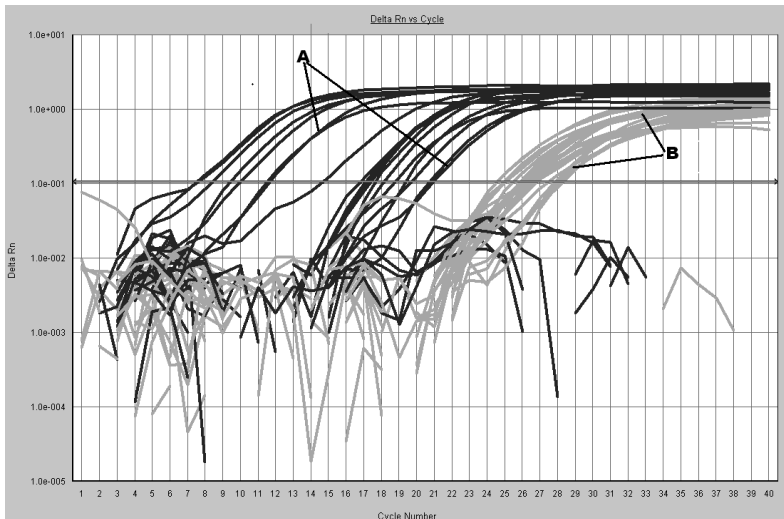


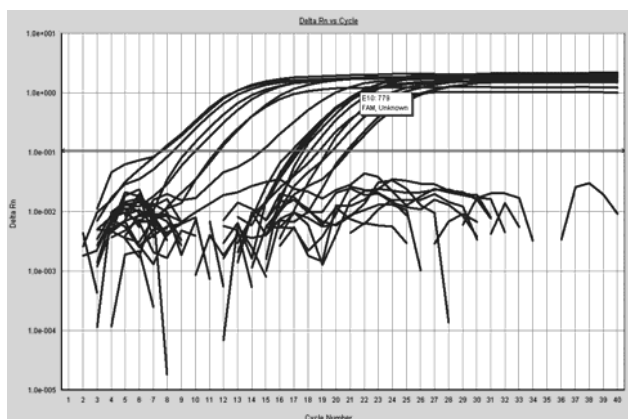
Рис. 1. Криві ампліфікації провірусної ДНК, сигнал вимірювання флуоресценції по каналу FAM (A), та внутрішнього контролю, сигнал вимірювання флуоресценції по каналу JOE (B).

Для оцінки придатності методу ПЛР (валідації) було визначено параметри, які дозволяють оцінити наскільки даний аналітичний метод забезпечує точність, правильність та відтворюваність отриманих результатів. Так, нами було виявлено, що ліміт детекції (LOD) провірусної ДНК становив 0,16 пг геномної ДНК ВРХ ($Ct_{LOD}=34$). Стандартні криві (графіки залежності граничного циклу (Ct) від логарифму початкової концентрації субстрату), отримані за результатами різних

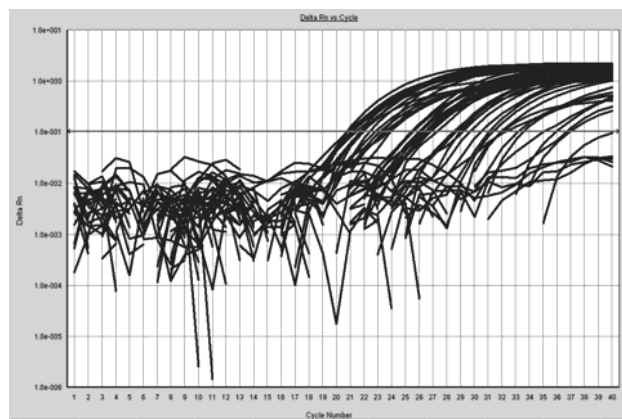
експериментів, характеризувались чіткою лінійною залежністю ($R^2 > 0,99$). Відповідні значення кута нахилу калібрувальної кривої становили ($E = -3,52$), що свідчить про високу ефективність ампліфікації даного методу.

Для оцінки чутливості запропонованого методу було відібрано 90 зразків, які мали позитивний результат у nested ПЛР (за попередніми даними) та проведено їхнє повторне дослідження в одностадійній ПЛР у режимі реального часу. В результаті дослідження ми отримали тільки 69 позитивних результати, що становить 77 % від загального числа досліджених голів ВРХ.

При оцінці значень C_t позитивних зразків, отриманих у порівнянні з двома методами спостерігалася різниця у 9-12 циклів. Так, у дослідженні nested ПЛР значення C_t позитивних зразків знаходиться у межах 9-20, а при використанні одностадійної ПЛР – в межах 22-36 циклів (рис. 2). Це дозволяє ефективніше проводити диференціацію позитивних зразків.



А



Б

Рис. 2. Криві ампліфікації провірусної ДНК, сигнал вимірювання флуоресценції по каналу FAM.

А – при дослідженні nested ПЛР, Б – при одностадійній ПЛР.

Виходячи з того, що значення C_t є прямо пропорційним логарифму початкової концентрації ДНК-мішені, стає зрозумілим, що така різниця в значеннях C_t

пов'язана з різною кількістю вихідного субстрату. Так, якщо при nested ПЛР відбувається накопичення ампліконів протягом 15 циклів у першій стадії і 40 циклів у другій, то при однастайній реакції 40 циклів може бути недостатньо для ампліфікації ДНК вірусу, що може негативно впливати на чутливість ПЛР. Використання більшого числа циклів в однастайній ПЛР, не рекомендується, оскільки відбувається виснаження компонентів реакційного середовища, особливо термостабільної ДНК полімерази, що призводить до виникнення неадекватних результатів.

Висновки. Запропонована нами модифікація nested ПЛР для виявлення вірусу лейкозу ВРХ дозволяє виявляти на 23% більше інфікованих тварин порівняно з однастайною ПЛР. Використання молекулярно-генетичних методів дослідження, зокрема ПЛР, у комплексі із серологічними методами для діагностики лейкозу ВРХ дозволить практикуючим лікарям ветеринарної медицини підняти на більш високий рівень діагностику лейкозної інфекції та підвищити ефективність проведення протиепізоотичних заходів щодо лейкозу великої рогатої худоби.

Список літератури

1. Возможности и ограничения использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Чичина С.В., Храмов В.В., Смирнов П.Н. и др. // Материалы Сибирской международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы ветеринарии". – НГАУ. – Новосибирск. – 2004. 2. Порівняльна ефективність діагностики лейкозу великої рогатої худоби при використанні різних методів дослідження. Абрамов А.В., Король Д.М., Мельничук С.Д. та ін. // Ветеринарна медицина України. – №2. – 2007. – С. 33-34. 3. Применение серологических методов и ПЦР для обнаружения вируса лейкоза крупного рогатого скота в образцах крови, молока и носовых истечений / Джапаралиев Н.Т., Прохвятилова Л.Б., Ломакин А.И., Аянот П.К. // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику (Материалы конференции молодых ученых). – Владимир: ОКНИИиМС, ВНИИЗЖ. – 2000. – С. 127-131. 4. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза КРС / Гулюкин М.И., Дун Е.А., Замираева Н.В. и др. // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2000. – №3. – С. 60-62. 5. A field evolution of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle / Eaves F.W., Mohillo J., Dimmock C., Eaves L. – 1994. – Vet. Microbiol. – V.39. – P. 313-321. 6. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection / Camargos M.F., Stancek D., Lessa L.M. et al. // Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2003. – V. 40(5). 7. Eurachem guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics LGC Limited, 1998. 8. Evemann J.F. A Look at How Bovine Leukemia Virus Infection is Diagnosed // Vet. Med. Assoc. – 1992. – V. 175. – 705-708. 9. Office International des Epizooties (OIE) (1992). Chapter 2.3.4. *Enzootic bovine leukosis*. In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Second Edition. OIE, Paris, France: P. 53-63. 10. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV proviruses a practical complement BLV diagnostics. Blankenstein P., Fechner H., Looman A. et al. // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. – 1998. – V. 111. – P. 180-186. 11. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. R. Boom, C. Sol, M. Salimans et al. // Journal of clinical microbiology. – 1990 (3). – V. 28. – P. 495-503.

FEATURES OF MOLECULAR DIAGNOSTICS OF ENZOOTIC BOVINE LEUCOSIS BY USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION

Ischenko L.M., Spyrydonov V.G., Melnychuk S.D., Martynenko D.L.

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of AIC Products, Kiev.

Abramov A.V., Korol D.N.

State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Vet.-San. Expertise, Kiev.

Nested PCR have been developed for the detection of proviral DNA of bovine leukemia virus in the blood samples. Oligonucleotide primers and fluorescent probes, specific to proviral DNA and internal control were designed. Validation of the real-time PCR has been done. It was shown that nested PCR more sensible by comparison to the one-stage usual PCR and enables to expose on 23% more infected animals.