

УДК 619:57.083.18:578.835.2

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ

К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов, М.Х. Саятов

РГП «Институт микробиологии и вирусологии», г. Алматы
kobey@nursat.kz

В статье представлены результаты экспериментальных работ по секвенированию М гена вируса гриппа лошадей, выбору консервативного участка gV гена вируса ринопневмонии лошадей, конструированию и подбору специфических праймеров. Приводятся данные по оптимизации параметров ПЦР для дифференциальной диагностики возбудителей этих широко распространенных инфекций.

Секвенированы М и gV гены вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей, проведено выравнивание с полными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных. Выбраны наиболее консервативные участки геномов для дальнейшей разработки праймеров.

Сконструированы сегментспецифические праймеры для постановки мультиплекс ПЦР с целью одновременной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей.

После тестирования при одинаковых условиях ПЦР отобраны наиболее оптимальные праймеры, работающие при одних и тех же параметрах термоциклирования.

Установлен оптимальный режим совместимости праймеров с обработкой температурно-временных показателей для постановки мультиплекс - ПЦР.

Ключевые слова: грипп лошадей, ринопневмония, дуплекс ПЦР, праймер.

Введение

Грипп и ринопневмония лошадей являются высококонтагиозными и опасными вирусными инфекциями лошадей. Они вызывают частые падежи и наносят значительный урон экономике сельского хозяйства Казахстана [1, 2].

Возбудители гриппа лошадей относятся к двум подтипам вируса - Influenza A/equine1 (H7N7) и Influenza A/equine2 (H3N8). Для первого вируса, как правило, характерны субклинические формы, в то время как второй вызывает острую респираторную инфекцию. Вирусы гриппа Influenza A/equine2 (H3N8) представлены двумя самостоятельными эволюционными линиями: Европейский тип и Американский. Заболевание ринопневмонией лошадей вызывают герпесвирусы двух типов - 1 и 4 [3].

Клиническая картина у инфицированных гриппом и ринопневмонией лошадей проявляется в виде респираторного синдрома (кашель, поражения органов дыхания) и снижения работоспособности, при ринопневмонии также характерны аборты у жеребых кобыл и паралитический синдром, все это в конечном итоге ведет к значительным потерям продуктивности и утере спортивных качеств.

Кроме прямого ущерба, эти инфекции создают преграды международной торговле и перевозкам как лошадей, так и большого арсенала грузов, подконтрольных ветеринарной службе. Так, во время эпизоотии в Казахстане в 2007 г. все переболевшие животные резко снизили товарную ценность.

В настоящее время в Казахстане диагностика вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей проводится главным образом с помощью иммунологических реакций (РТГА, РГАд) после выделения возбудителей в развивающихся куриных эмбрионах и культурах клеток, так как вызываемые ими клинические картины сходны. Такой способ диагностики требует больших затрат времени и средств на его проведение [4]. Кроме того, существенно снижается ценность РТГА, для которой характерна штаммовая специфичность при идентификации различных подтипов вируса гриппа, обладающих высокой антигенной вариабельностью.

Несмотря на широкое применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике заболеваний, с ее помощью можно обнаружить только один инфекционный агент, в то время как мультиплекс ПЦР позволяет выявить несколько возбудителей одновременно в одной реакции, что значительно снижает стоимость диагностических процедур при сочетании высокой чувствительности и скорости реакции.

В связи с этим разработка предлагаемой нами мультиплексной ПЦР тест-системы с использованием последних достижений молекулярной биологии, является актуальной задачей,

направленной на своевременную дифференциальную диагностику вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей с целью оптимизации мероприятий по контролю над распространением возбудителей этих опасных вирусных инфекций в Казахстане.

Материалы и методы

Сбор полевых материалов. Для вирусологических и молекулярно-биологических исследований от лошадей собирали носоглоточные смывы, которые брали стерильным ватным тампоном с пластиковой ручкой и помещали во флаконы с транспортировочной средой. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Выделение РНК из биологических образцов. Выделение РНК вируса гриппа лошадей проводили с использованием набора QIAampViral RNA Minikit (QiagenGmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Выделение ДНК из биологических образцов. Выделение ДНК вируса ринопневмонии лошадей проводили с использованием набора DNeasyandTissueKit (QiagenGmbH, Hilden) согласно прилагающемуся протоколу.

Получение кДНК из РНК методом обратной транскрипции. кДНК получали из образцов РНК, применяя следующие параметры реакции: РНК - 4 мкл, праймер uni-12 – 0,5 мМ, инкубирование 5 мин при 72°C, добавление реакционной смеси, содержащей dH₂O – 2,25 мкл, буфер ревертазы (Promega, #A3561) – 1 мкл, дНТФ(Promega, #U1511) – 0,5 мкл, ингибитор РНКаз (Promega, #N2615) – 0,5 мкл, ревертазу(Promega, #M5108) – 1,25 мкл. Смесь инкубировали в течение 60 мин при 42°C и далее 5 мин при 95°C. Окончательный объем кДНК составил 40 мкл.

Секвенирование фрагментов ДНК по методу Сенгера. Секвенирование ДНК выполняли в Национальном центре биотехнологии с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе ABI 3730xlDNAanalyzer (Applied Biosystems).

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей с полными нуклеотидными последовательностями соответствующих генов из международной базы данных Genbank осуществляли с помощью компьютерной программы BioEdit. В работе использовали последовательности штаммов вирусов гриппа лошадей сублиний Флорида 1 и 2, доминирующих в последние годы в Азиатском регионе: из Китая (EU794514), Монголии (AB436913), Японии (AB544413), а также референсный штамм А/лошадь/Майами/1/1963(CY028837).

Для выравнивания нуклеотидной последовательности gВ гена вакцинного штамма СВ/69 с таковыми вирусов ринопневмонии лошадей использовали также последовательности с инвентарными номерами EU087297, M36298, EU087293, AB279609, DQ095871, депонированные в Генбанке, представляющие различные географические регионы.

Конструирование сегментспецифических праймеров. Конструирование праймеров проводили с помощью компьютерной программы OligoExplorer. Праймеры выбирали, применяя следующие параметры:

- длина праймеров 18-22 п.н.о.;
- процентное содержание G+C пар – 40-60;
- отсутствие залипания праймеров на самих себя;
- отсутствие образования димеров;
- температура плавления в пределах 55-58°C;

Мультиплекс полимеразная цепная реакция. Тестирование праймеров, полученных к различным фрагментам консервативных последовательностей М или gВ генов вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей проводили при одинаковых условиях постановки ПЦР с отбором наиболее подходящих. Оптимальный режим совместимости праймеров к вирусам гриппа и ринопневмонии лошадей устанавливали при их одинаковых концентрациях и условиях термоциклирования в мультиплекс – ПЦР. Подбор оптимального режима для постановки мультиплекс - ПЦР проводили путем варьирования параметров температуры и времени. Реакцию ставили в термоциклере Eppendorf Gradient (Германия).

Пробы кДНК и ДНК вносили одновременно каждой по 2 мкл в реакционную смесь.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР. Электрофорез проводили в 2% растворе агарозы (Sigma, США) в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Bioster (Великобритания).

Результаты и обсуждение

Для секвенирования М гена вируса гриппа лошадей, igВ гена вакцинного штамма вируса ринопневмонии определяли концентрацию нуклеиновых кислот, которая составила более 200 нг/мкл.

Секвенирование М гена изолята вируса гриппа лошадей проводили с набором праймеров, рекомендованных для секвенирования всех сегментов генома вирусов гриппа А [5].

Методом BLAST-анализа [6] проведено исследование генома вируса ринопневмонии лошадей, имеющихся в международной базе данных.

Известно, что геном вируса ринопневмонии EHV-4 состоит из 145 597 пар нуклеотидов и условно разделен на длинный уникальный регион, фланкированный коротким инвертированным повтором, и короткий уникальный регион, фланкированный основным инвертированным повтором, и состоит, также как и EHV-1, из 76 открытых рамок считывания.

По нуклеотидному составу геномы изолятов вируса ринопневмонии EHV-1 проявляют до 99% идентичности, тогда как сходство между вирусами EHV-1 и EHV-4 составляет до 85%.

Для конструирования праймеров был выбран консервативный участок генома – ген, кодирующий белок поверхностной мембраны gB, который имеет 89,6% идентичность с соответствующим геном EHV-1.

В результате проведенных выравниваний секвенированных последовательностей выявлены консервативные участки геномов и сконструированы специфические праймеры, пригодные для наработки сегментов М гена вируса гриппа лошадей, и gB гена вирусаринопневмонии.

На рисунках 1 и 2 на черном фоне выделены сайты отжига праймеров. Синтез праймеров осуществлен в компании Sigma-Genosys.

```
GCTCTCCAACGAACTCGCCAGGCTGTACCTGAACGAGCTTGTGAGATCTAACCAGCCTACGACCTAAAAAATC
TATTGAACCCCAATGCAAACAATAACAATAACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCCCCTGTCCAGTACCAGAACCT
CAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAGAGAACAATTTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGGCAACCGG
CAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACAGCTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGAGTTTGCC
ATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCCACGTCATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGT
ACCCTCCAAAACAAGAGCGGACCCATGGAACGAAATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAAC
CCTTGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGGACGTGATAGCTATAACGCACTGCGCCAAAATAGAGGGC
AACGTGTACTTGCAAACTCCATGCGCTCGATGGACAGTAACACGTTGCTACTCCCGCCCCCGTAAACATTTAC
AATTAAGAAATGCAAACAACAGAGGGTTCGATAGAAGGCCAGCTGGGAGAGGAGAACGAGATTTTACCGGAG
CGCAAGCTGATCGAGCCGTGCGCCCTCAATCAGAAGCGTACTTTAAGTTTGGCAAAGAGTACGTTTACTACGA
GAACTACAGCTTTCGTCGCAAAAGTGCCCCACGGAATCGAGTTATCAGCAGCTAGTTGAACCTAACTTTGA
CCCTTTTGGAAAGACCGGAGTTTCTGCCCTGGAGGTGTACACGCGGGCTGAGCTGGAGGACACCGGCCTGCT
AGACTACAGCGAAATACAGCGCCGCAACCAGCTCCACGCTCTCAGGTTTTACGACATCGACAGCGTGGTCAAC
GTGGACAATACCGCAGTGATTATGCAGGGGATCGCCAGCTTTTCAAGGGCCTGGGTAAAGTGGGGGAGGCCG
TGGGAACGCTCGTTCTCGGCGCCGCGGCGCTGTTGTTCAACCGTATCTGGAATAGCTTGGTTTTAAACAAC
CCATTTGGGGGGCTAGCCATCGGCCTGCTGGTAATCGCCGGCCTGGTAGCTGCGTTTTTTGCTTACAGAT
```

Рис. 1. Консенсусная последовательность гена, кодирующего белок поверхностной мембраны gB вирусов ринопневмонии и участки закрепления праймеров

```
ATGAGNCTTSTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCNTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTCAGGGGAAGA
ACACCGATCTTGAAGCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACTCTGACTAAGGGGATTTAGGGTTTGTGTTACCGCTCACCGTCCCAAGTGA
GCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGAACCCAAACAACATGGACAGAGCAGTNAACNTACAGGAAGCTGAAAAGAGA
GATAACATTCATGGGGCTAAGGAGGTNGCACTACGTAAGTCACTGCTGCACTTGCAGTTCCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACNGTGACCACAGAA
GTGGCTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTGTGAGCAGATTGCTGATTCACAGCATCGGCTCAGAGGAGATGGTNACTACCACCAATCCCAATCAGGCATGAAA
ACAGAAATGGTGTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCTGGATCGAGTGAAGCAGGCGAGCNGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAG
ATGGTGCANGGCAATGAGAAATTTGGGACTCATCTAGCTCCAGTGTGGTCTGAAAGATGATCNTTCTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGAGT
GCAAAATGCAGCGATTCAAGTGNATCCTCTCGTTATTCGNGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACCTTGATATTGTGATTTGATCGCTTTTCTCAAATGNATTTATC
GTCGCNNTAAATACGGTTTGAAGAGGGCCCTTACGGAAGGAGTGCTGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGNCAAGAACAGCAGAGTGTGGTGTGGTGTGAGC
ATGGTCATTTTGTG
```

Рис. 2. Консенсусная последовательность М гена вируса гриппа лошадей и участки закрепления праймеров

В результате проведенных экспериментов для одновременной диагностики в мультиплекс ПЦР были отобраны две пары наиболее оптимальных праймеров. Их характеристики приведены ниже в таблице.

Таблица – Характеристика оптимизированных для совместной работы сегментспецифических праймеров для диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей в мультиплекс ПЦР

Вирус	Обозначение	Направление	Последовательность, 5'--->3'	Ожидаемый продукт
ВГЛ	primer_FluM-1 F	прямой	GCCCTAAATGGGAATGGA	244 п.о.
	primer_FluM-1 R	обратный	GCCTGTGAGACCGATGCT	
РПЛ	primer_gB-F	прямой	ATCTAACCGCACCTACGA	517 п.о.
	primer_gB-R	обратный	TCGATGGACAGTAACACG	

Как видно из таблицы, отобранные пары праймеров ограничивают специфический участок ДНК в 244 и 517 пар оснований.

Для постановки реакции использовали Taq-полимеразу Fermentas (#EP0402, Германия) и оптимизированную смесь компонентов на каждую пробу: qH₂O – 13,88 мкл, 10x Taq-буфер (Fermentas #B38) – 2,5 мкл, dNTP 10 мМ (Fermentas #R0192) – 1 мкл, праймеры в концентрации 0,5 μM FluM-1 F – 0,125 мкл, FluM-1 R – 0,125 мкл, _gB-F – 0,125 мкл, _gB-R – 0,125 мкл, Taq-полимераза – 0,125 мкл, магния хлорид (Fermentas #R0971) – 2 мкл, ДНК и кДНК – каждой по 2 мкл.

Проведены эксперименты по тестированию всех сконструированных в лаборатории экологии вирусов праймеров к фрагментам консервативных последовательностей M и gB генов вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей, которые охватывают участки геномов в 244 и 517 пар оснований соответственно, варьируя температурно-временные режимы.

ПЦР проведена с одновременным использованием в одной реакции праймеров в установленной опытным путем концентрации 0,5 микромоль при одинаковых условиях ПЦР с изолятом А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8) и вакцинным штаммом вируса ринопневмонии лошадей СВ/69. ПЦР проводили в термоциклере Eppendorf Gradient при следующих условиях: начальная 2 мин денатурация при 94°C и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (56°C, 30 сек) и удлинение цепи (72°C, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин. Окончательные результаты испытаний отражены на рисунке 3.



Примечание: 1, 2, 3 и 4 комплементарные ДНК вирусов гриппа и ринопневмонии

Рис. 3. Электрофореграмма мультиплекс ПЦР с испытуемыми праймерами

Как видно из рисунка 3, в результате реакции с праймерами к участкам M и gB генов вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей при температуре отжига +56°C получены положительные результаты с обнаружением специфических продуктов в 244 и 517 пар оснований

Таким образом, разработанная нами тест-система может быть использована для дифференциальной молекулярной диагностики вирусов гриппа и ринопневмонии лошадей в ветеринарных лабораториях, оснащенных оборудованием для проведения ПЦР.

Выводы

1. Секвенирование M гена вируса гриппа лошадей, выделенного в Казахстане в 2007 г., и исследование gB гена вируса ринопневмонии лошадей, с последующим выравниванием с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов из международной базы данных позволило выбрать наиболее консервативные участки геномов.

2. Сконструированные сегментспецифические праймеры показали высокую эффективность при тестировании в оптимизированных температурно-временных параметрах ПЦР – 56°C 30 сек.

3. Разработанная дуплекс ПЦР тест – система позволяет одновременно выявить наличие нуклеиновых кислот вирусов гриппа и/или ринопневмонии лошадей в одной пробирке.

Благодарность. Авторы выражают признательность сотрудникам Национального центра биотехнологии Шевцову А. и Жолдыбаевой Е. за помощь, оказанную в выполнении работ по секвенированию вирусов. Работы выполнены в рамках грантового проекта «Разработка технологии производства инновационных противовирусных препаратов для контроля вирусных инфекций», бюджетной программы 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность», подпрограмма 101 «Грантовое финансирование научных исследований», по приоритету «Науки о жизни».

Литература

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Парамиксовирусные инфекции // Вирусные болезни животных. – 1998. – М.: ВНИТИБП. – С. 214-233.
2. Кыдырманов А.И., Кумекбаева Ж., Карамендин К.О. и др. Изоляция вируса гриппа а (H3N8) от лошадей в Казахстане в 2007 г. // НПЖ Ветеринария. – 2009. - №1 (5). - С. 52-54.
3. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.5.9. Equine rhinopneumonitis. – 2008. – P. 894-903.
4. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/20-02.5. - 2003. – P. 3-4.
5. Hoffmann E., Stech J., Guan Y. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses// Arch Virol. - 2001. - Vol. 146. – P. 2275-2289.
6. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic local alignment search tool, J Mol Biol. - №215. – 1990. - P. 403–410.

Түйін

Грипп және ринопневмония вирустарының М және gB гендерін секвенделіп, халықаралық деректер қорынан толық нуклеотид тізбегімен шендестіріліп зерттелінді.

Грипп және ринопневмония вирустарын бірізгіде балауға мультиплекс полимеразды тізбекті реакциясын қою үшін сегментке тәнді праймер құрастырылды.

Полимеразды тізбекті реакциясының бірдей жағдайында сынағанан кейін термоциклдеудің сол параметрлерінде жұмыс істейтін аса оңтайлы праймерлер сұрыпталынып алынды.

Мультиплекс - ПЦР қою үшін праймерлердің сәйкес жұмыс істеу оңтайлы температуралымен уақыт параметрі анықталды.

Кілтті сөздер: жылқы тұмауы, ринопневмония, дуплекс ПТР, праймер.

Summary

Equine influenza and rhinopneumonia are highly dangerous viral infections in horses. They cause significant damage to the economy of Kazakhstan's agriculture.

The clinical picture of horses infected with influenza and rhinopneumonia manifests as respiratory symptoms (cough, respiratory lesions) and reduced work capacity, rhinopneumonia also characterized by abortion in mares and paralytic syndrome in foals, all this eventually leads to a significant loss of productivity and athletic qualities.

Currently diagnosis of equine influenza and rhinopneumonia in Kazakhstan carried out mainly by immunological reactions (HIA and haemadsorption assay) after isolation of pathogens in developing chick embryos and cultured cells, as they cause similar clinical pictures. This diagnostic method is time consuming for their implementation.

Despite the widespread use of the polymerase chain reaction (PCR) in diagnosis of these diseases, conventional PCR can be used to detect only one infectious agent, while multiplex PCR allows the identification of several pathogens either together or separately, in a single reaction, which significantly reduces the cost of diagnostic procedures at combination of high sensitivity and short time.

In connection with that, we propose a multiplex PCR kit applying the latest achievements of molecular biology. This is an important task, ensuring timely differential diagnosis of equine influenza and rhinopneumonia viruses to optimize measures to control the spread of these dangerous pathogens of viral infections in Kazakhstan.

For implementation of the tasks, we sequenced M and gB genes of equine influenza and rhinopneumonia viruses. They were aligned with full genome sequences Genbank were studied that allows selecting most conserved sites for construction of segment-specific primers.

Segment-specific primers were constructed for simultaneous diagnosing of equine influenza and rhinopneumonia in multiplex PCR.

After testing at the same PCR conditions most optimum primers working at similar thermocycling parameters have chosen.

Primers compatibility regime is defined by working out optimum temperature-temporal parameters for running multiplex PCR.

Keywords: equine influenza, equine rhinopneumonitis, duplex PCR, primer.