

На правах рукописи

УДК: 619:616.98:578.823.1:577.2



ГАВРИЛОВА ЕКАТЕРИНА АНАТОЛЬЕВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ МОНИТОРИНГА БЛЮТАНГА НА
ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

**06.02.02.- Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
кандидат ветеринарных наук
Луницын А.В.

Покров, 2010

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии).

Научный руководитель

кандидат ветеринарных наук

Луницын Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор

(ФГУ ВНИИЗЖ, г. Владимир)

Рыбаков Сергей Сергеевич

доктор ветеринарных наук,

профессор

(ФГУ ЦНИМВЛ, г. Москва)

Белусов Василий Иванович

Ведущая организация – Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково.

Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии по адресу: 601120, Владимирская обл., Покров, ГНУ ВНИИВВиМ. Тел/факс: (49243) 62125.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ.

Автореферат разослан «26» октября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
ГНУ ВНИИВВиМ
Россельхозакадемии
кандидат биологических наук



Е.А. Балашова

2010А
24480

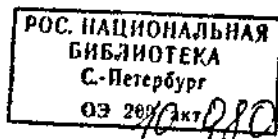
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

В 2006 г. в Западной Европе было зарегистрировано заболевание блютангом. В последующем установлено, что болезнь вызывается вирусом, относящимся к 8 серотипу. Актуальность блютанга для Российской Федерации значительно возросла с начала 2006 г., когда российскими внешнеторговыми организациями был начат импорт племенного крупного рогатого скота из стран Евросоюза, в том числе из неблагополучных по нему стран. Блютанг может быть занесен в Россию не только из стран Евросоюза, но и из стран Центрально-Азиатского и Дальневосточного регионов. Кроме того, на территории России есть все условия для «укоренения» заболевания. Прежде всего – это наличие различных видов мокрецов, потенциальных резервуаров и переносчиков вируса (*C. dewulfi*, *C. obsoletus*, *C. pulicaris* и др), которые вызвали распространение болезни в странах Европы (Захаров В.М., 2007, 2009). В целом необходима строгая целенаправленная система, предусматривающая комплекс мер по недопущению заноса болезни, включающих раннюю диагностику, четкие схемы мониторинга и надзора, эффективные противоэпизоотические мероприятия. Согласно «Санитарному кодексу наземных животных МЭБ» основными методами диагностики блютанга при экспорте животных являются ИФА и ОТ-ПЦР. Одним из достоинств ПЦР-анализа является обнаружение вирусного генома у животных, начиная с первых дней заболевания, когда еще не сформировался иммунный ответ организма.

Таким образом, при ввозе животных из неблагополучных стран или зон, а также в ходе проведения противоэпизоотических мероприятий при вспышках блютанга необходимо проведение быстрых и эффективных лабораторных исследований, позволяющих в кратчайшие сроки выявить возбудитель.

Избирательная амплификация отдельных участков вирусного генома с помощью полимеразной цепной реакции, дополняя серологические методы, открывает новые возможности для разработки тест-систем для идентификации вируса блютанга. В 2003 г. Снетковым К.А. были разработаны наборы препаратов для выявления РНК вируса блютанга и ЭГБО методом ПЦР с электрофоретической детекцией результатов. В 2008 г. сотрудниками лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ был



усовершенствован набор препаратов для выявления генома вируса блютанга методом ПЦР с электрофоретической детекцией.

Одним из перспективных направлений является использование метода ПЦР в режиме реального времени. Его принципиальной особенностью является количественная оценка динамики накопления продуктов полимеразной цепной реакции с автоматической регистрацией результатов. Он позволяет получать результат в 2-3 раза быстрее по сравнению с классической ПЦР с электрофоретической системой детекции; снижает риск контаминации, связанный с исключением 3-го этапа ПЦР (электрофореза); использование внутреннего контрольного образца (ВКО) позволяет проследить прохождение реакции в каждой пробе, что согласно новым рекомендациям МЭБ (OIE, 2008) является необходимым условием при создании тест-систем на основе ПЦР.

Цель и задачи исследований

Целью данной работы является совершенствование и разработка молекулярно-биологических средств мониторинга блютанга в пробах крови и патологического материала на основе полимеразной цепной реакции.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Подобрать специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды для идентификации генома вируса блютанга.

2. Разработать тест-систему на основе метода ПЦР в режиме реального времени для идентификации генома вируса блютанга, содержащую внутренний контрольный образец (ВКО), при исследовании материала от инфицированных животных.

3. Провести сравнительное изучение чувствительности и специфичности разработанных тест-систем с использованием праймеров, комплементарных различным участкам генома вируса блютанга.

4. Провести мониторинговые исследования на наличие генома вируса блютанга в пробах крови, взятых от импортированных животных, с использованием разработанных тест-систем.

Научная новизна работы

Подобраны специфические олигонуклеотиды к различным сегментам генома ви-

руса блютанга, использование которых в ПЦР позволяет выявлять вирус в низкой концентрации.

Разработана «Тест-система» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени для выявления генома вируса блютанга с использованием внутреннего контрольного образца. Показана высокая чувствительность метода, которая составила $1,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Модифицированная методика ОТ-ПЦР в режиме реального времени с предварительной амплификацией специфического участка кДНК позволила повысить чувствительность метода до $0,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

С помощью комплекса молекулярно-биологических методов (ОТ-ПЦР в режиме реального времени, нуклеотидного секвенирования и последующего филогенетического анализа 10-го сегмента генома) при исследовании животных, импортированных из стран ЕС, идентифицирован 8-ой серотип вируса блютанга.

Установлено, что геном вируса блютанга выявляется в пробах крови и патологического материала от инфицированных животных в течение 90 дней у овец и 173 дней у КРС (период наблюдения), начиная с 3 дня после заражения.

Практическая значимость

Разработанная «Тест-система для выявления генома вируса блютанга (ВБ) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» утверждена Россельхознадзором (ПВР-1-5.0/02618 от 30.08.20010г.) и внедрена в практику для выявления РНК вируса блютанга в пробах крови, патологического материала и в инфицированных культурах клеток.

Для использования ветеринарной практикой разработаны «Методические рекомендации по выявлению генома вируса блютанга (ВБ) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени», утверждены директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (28.12.2009г.), а также рассмотрены и одобрены на секции «Инфекционной патологии» Отделения ветеринарной медицины РАСХН (30.09.2010г.).

Публикации результатов исследований

По теме диссертации опубликовано 5 научных статей, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ.

Апробация работы Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ (2008-2010 гг.).

Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии «Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины» (г. Покров, 2009 г.), Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», посвященной 40-летию ВНИТИБП (г. Щелково, 2009г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Получена тест-система на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени, содержащая внутренний контрольный образец, для идентификации генома вируса блютанга в пробах крови и патологического материала от инфицированных животных.

2. Установлена чувствительность и специфичность усовершенствованных и разработанных тест-систем с использованием праймеров, гомологичных различным сегментам генома вируса блютанга.

3. Получены данные мониторинговых исследований распространения блютанга на территории РФ с использованием разработанных тест-систем на основе ОТ-ПЦР.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 145 страницах, включая приложение. Иллюстрирована 26 таблицами и 28 рисунками. Список литературы включает 135 источников, в том числе 99 зарубежных авторов.

Личный вклад автора в выполнении работы

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы оказывали следующие сотрудники института: к.б.н. Малоголовкин А.С. (освоение молекулярно-биологических методов, клонирование рекомбинантной плазмиды). Часть работы по выделению вируса выполнена совместно с аспирантом лаборатории Диагностики Вялых И.В. и сотрудником Отдела биологического и технологического контроля (ОБТК) Бобровской И.К.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1. Вирусы: В работе использованы штаммы вируса блютанга 8, 2, 4, 9, 16 серотипов, полученные из музея ГНУ ВНИИВВиМ: SPA 2005/05 (полевой изолят, 4 серотип), E2/ВНК6 (8 серотип), E3/ВН16 (9 серотип), «Тапхар» (16 серотип); 8 серотип РФ (полевые изоляты фн/5-09 и ФКл/4-09), выделены сотрудниками лаборатории

Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ; эпизоотический шт. 8-го серотипа - BTV NET 2006-A, 1 серотип Испания (BTV-1 Spain), 4 серотип Испания (BTV-4 Spain) получены из научно-исследовательского Центра CIDC – Лелистат (Нидерланды). Шт. «Нью-Джерси», «Альберта», «А 496», WA вируса ЭГБО (Эпизоотическая геморрагическая болезнь оленей); вирус болезни Ибараки (шт. «Сасаки»); вирус АЧЛ (Африканская чума лошадей) 6, 8, 9 серотипов получены из музея ГНУ ВНИИВВиМ.

2.1.2. Пробы крови и патматериала от естественно инфицированных и экспериментально зараженных овец и КРС: пробы крови и органов от телят и овец, экспериментально зараженных 1, 4, 8 серотипами вируса блютанга, взятые на разные сутки после заражения, предоставлены сотрудниками лаборатории Диагностики, а также сотрудниками Отдела биологического и технологического контроля. Лимфоузлы и селезенка от овец и КРС, зараженных ВБ (вирусом блютанга) 1, 8 серотипов.

2.1.3. Культуры клеток: перевиваемая линия клеток Vero, культуры клеток ВНК-21, ПСГК. 10% суспензия из головного мозга здоровых мышей.

2.1.4. Животные: телята чёрно-пёстрой породы 3-4-мес. возраста; первотёлки (за 1,5-2 месяца до отела) голштино-фризской породы; ягнята романовской породы и породы меринос 6-12 мес. возраста; нетель черно-пестрой породы в возрасте 6 мес., доставленная из хозяйства «Узольские ключи» Нижегородской области.

2.1.5. Плазмида и бактериальные штаммы: для клонирования ПЦР-продуктов использовали коммерческий набор QIAGEN PCR Cloning Kit («QIAGEN», Германия). В качестве вектора для клонирования использована плазмида pDrive Cloning Vector 3,85 kb.

Трансфекцию рекомбинантной плазмиды проводили в клетки E.coli шт. TOP 10 («Promega», США).

2.1.6. Реактивы

Для выделения нуклеиновых кислот: гуанидин тиоцианат (Fluka Biochemika №50990); Trizol LS («Invitrogen»); деионизированная вода; сорбент нуклеиновых кислот (силика) («Helicon», г. Москва); трис-НСl («Serva»); борная кислота (о.с.ч.); ЭДТА («Serva»); этиловый спирт 96%; хлороформ; фенол; изоамиловый спирт.

Для проведения обратной транскрипции и ПЦР: 5x реакционный буфер Амплисенс Blue («Интерлабсервис», г. Москва); 5x реакционный ПЦР буфер

(«Fermentas», Латвия); 5x реакционный буфер для обратной транскрипции («Интерлабсервис», г. Москва); смесь нуклеозидтрифосфатов 25mM («Fermentas», Латвия); специфические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды (ЗАО «Синтол», «Литех» г. Москва); магний хлористый (25mM); Таq-ДНК-полимераза (5ед./мкл); ревертаза-MMLV («Интерлабсервис», г.Москва); минеральное масло для ПЦР («Интерлабсервис»);

Для проведения электрофореза: агароза («Helicon», г. Москва); бромид этидия («Helicon», г. Москва); маркеры молекулярной массы («Fermentas», Латвия);

Для секвенирования: формамид; 10x буфер с ЭДТА; big dye v.3.1. terminator; полимер POP 7 («Applied Biosystems», США).

2.2. Методы

2.2.1. Выделение и очистка нуклеиновых кислот Для исследования были использованы пробы органов (печень, легкие, сердце, селезенка, лимфатические узлы) от вынужденно убитых и павших животных, кровь инфицированных животных, а также инфицированные культуры клеток.

Для выделения вирусной нуклеиновой кислоты из проб цельной крови использовали пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА или ацетатом калия). Последующее выделение тотальной РНК из патологических материалов, цельной крови и инфицированных культур клеток проводили по модифицированной методике Boom et al. (1990), либо с использованием гуанидинового буфера с фенол-хлороформенной экстракцией, а также с применением наборов «Рибо-преп» («Интерлабсервис») и Trizol LS. Полученный раствор РНК сразу использовали в ПЦР.

2.2.2. Постановка ОТ-ПЦР

Исследования по выявлению генома вируса блютанга осуществляли при помощи тест-систем и наборов препаратов на основе «гнездовой» и «стандартной» ОТ-ПЦР, разработанных в ГНУ ВНИИВВиМ (2006г., 2008г.).

Для проведения различных вариантов ОТ-ПЦР использовали термоциклеры «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва) или PalmCycler (Corbett Research, Австралия) и пробирки емкостью 0,5 см³ и 0,2 см³.

ОТ-ПЦР для выявления РНК ВВ проводили с предварительной денатурацией со специфическими праймерами при 88°C в течение 10 мин; под масло вносили выделенную РНК в объеме 8 мкл. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин

при 42°C с использованием следующих компонентов, согласно инструкции по применению: смеси праймеров (10 пкм каждого) – 2 мкл; ревертазы-MMLV – 1 ед; буфера для обратной транскрипции – 5 мкл; деионизированной воды.

Для дальнейшей амплификации применяли: смесь праймеров (10 пкм каждого) 2,0 мкл; dNTP (25 мМ) 0,5 мкл; MgCl₂ (25 мМ) 0,5 мкл; 5X буфер для ПЦР (Ампликсенс Blue) 5 мкл; Taq ДНК-полимеразу 1 ед.; кДНК (исследуемый образец) 5 мкл; деионизированную воду до 25 мкл.

Переносили пробы в амплификатор и проводили «стандартную» ОТ-ПЦР при следующих режимах: 94°C – 2 мин; 94°C – 15 сек, 62°C – 15 сек, 72°C – 15 сек (42 цикла); 72°C – 2 мин. Для «гнздовой» ОТ-ПЦР: 94°C – 2 мин; 94°C – 30 сек, 57°C – 30 сек, 72°C – 30 сек (25 циклов); 72°C – 5 мин.

В каждой серии анализов использовали контрольные образцы: положительный контроль (инактивированный культуральный вирус блютанга 8-ого серотипа), и отрицательный контроль (деионизированная вода). Смеси для контрольных образцов готовили по той же прописи, что и для исследуемых образцов.

2.2.3. Анализ ПЦР продуктов Анализ продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза в 1,5 – 2,0% агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА и напряжении 170 В.

Результаты ПЦР оценивали обнаружением специфических полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента в пробе с положительным контролем. С помощью маркера молекулярной массы («Fermentas», Латвия) вычисляли размеры исследуемых продуктов реакции.

Электрофорез проводили в течение 20 минут. Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Регистрацию полученных результатов проводили с помощью геледокументирующей системы.

2.2.4. ПЦР в формате реального времени

В работе использовали технологию гибридизационных флуоресцентных зондов – TaqMan, основанную на детекции репортерной флуоресценции при гидролизе меченого зонда. В ходе амплификации, когда флуорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Во время синтеза ПЦР – продукта за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-

полимеразы, зонд разрушается и флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от тушителя, что генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплифицируемого фрагмента. За основу была взята методика, предложенная J.F. Toussaint и Kris De Clerq (2007).

Обратную транскрипцию проводили аналогичным способом, также как и для классического варианта ОТ-ПЦР.

Амплификацию и детекцию репортерной флуоресценции проводили в термоциклерах «IQ-5» (BioRad, США) и «Rotorgene 6000» (Corbett Research, Австралия) по двум каналам. Постановку ПЦР в реальном времени проводили в пробирках или плашках емкостью 0,2 см³.

Параметры реакции и состав ПЦР-смеси указаны в результатах исследований.

2.2.5. Нуклеотидное секвенирование Нуклеотидное секвенирование полноразмерного 10 сегмента генома вируса блютанга проводили с использованием специфических праймеров на концевые участки сегмента. Выделение специфических продуктов амплификации из агарозного геля или реакционной смеси осуществляли коммерческим набором для выделения нуклеиновых кислот «DNA purification kit» («Fermentas», Латвия), с последующей реамплификацией фрагментов при помощи компонентов «BigDye v. 3.1. Terminator» («Applied Biosystems», США).

Секвенирование проводили в автоматическом анализаторе Genetic Analyzer 3130XL («Applied Biosystems», США).

2.2.6. Программное обеспечение Для разработки специфических праймеров и зондов использовали пакет прикладных программ «Bio Edit», «Oligo 6.0». Специфичность рассчитанных олигонуклеотидов проверяли при помощи интернет-сервиса BLAST (<http://www.BLAST.NCBI.nlm.nih.gov>).

2.2.7. Постановка ИФА Сэндвич-вариант иммуноферментного анализа для выявления специфических антигенов вируса блютанга был выполнен сотрудниками лаборатории Диагностики.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Сравнительные исследования чувствительности и специфичности вариантов ОТ-ПЦР с использованием праймеров, гомологичных различным сегментам генома вируса блютанга

Для проведения исследований в работе использованы варианты ПЦР, ранее разработанные в нашем институте: «стандартная» ОТ-ПЦР и «гнездовая» ОТ-ПЦР (табл.1).

С целью повышения чувствительности «стандартной» ОТ-ПЦР нами был подобран дополнительный олигонуклеотид (10SN к паре 10SF и 10SR), комплементарный участкам 10-го сегмента генома. Анализ нуклеотидных последовательностей участков 10-го сегмента геномов различных изолятов вируса блютанга, взятых из базы данных GenBank (NCBI), проводили с применением пакета прикладных программ «Bio Edit». На консервативный участок 10-го сегмента РНК был рассчитан специфический праймер 10SN с использованием программы «Oligo 6.0». Специфичность праймера 10SN с последовательностью 5'-agc gca acc aca gca gcc act-3' проверена при помощи интернет-сервиса BLAST.

Таблица 1. Характеристика различных вариантов ПЦР-анализа

Название реакции	Используемые праймеры	Комплементарные участку генома	Размер продукта
«Стандартная» ОТ-ПЦР	10SF 5'-cat gct atc cgg gct gat cca aa-3'; 10SR 5'-cat cat cac gaa acg ctt ctg c-3'	10 сегменту генома, кодирующего неструктурный белок NS3	250 п.о.
«Полугнездовая» ОТ-ПЦР	10SF 5'-cat gct atc cgg gct gat cca aa-3'; 10SN 5'-age gca acc aca gca gcc act-3'; 10SR 5'-cat cat cac gaa acg ctt ctg c-3'	10 сегменту генома, кодирующего неструктурный белок NS3	10SF - 10SN = 396 п.о. 10SF - 10SR = 250 п.о.
«Гнездовая» ОТ-ПЦР	<u>1 раунд:</u> G34 5'-ggt aaa aat cta tag aga atg-3'; G35 5'-gta agt gta atc taa gag-3' <u>2 раунд:</u> G36 5'-aca act gat gct gcg aat ga-3'; G37 5'-aac cca cac ccg tgc taa gtg g-3'	7 сегменту генома, кодирующего VP7 белок	1 раунд: 1156 п.о. 2 раунд: 769 п.о.

Процедура постановки «полугнездовой» ОТ-ПЦР являлась сходной со «стандартным» вариантом ОТ-ПЦР, за исключением добавленного шага амплификации с внешним праймером при тех же температурных режимах. При постановке «полугнездового» варианта ОТ-ПЦР для 1-го и 2-го раундов использовались те же температурные режимы, что и для «стандартной» ОТ-ПЦР. Только для первого раунда брали праймеры 10SF-10SN, а для второго – 10SF-10SR.

3.1.1. Изучение чувствительности и специфичности «полугнездовой» ОТ-ПЦР

Определение чувствительности отобранных вариантов ПЦР проводили путем выявления вирусной РНК в серии приготовленных десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-5}) культурального вирусосодержащего материала с титром вируса $6,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Для заражения культуры клеток ПСГК использовали 8 серотип вируса блютанга.

Анализ данных показал, что при проведении одностадийной ОТ-ПЦР и «гнездовой» ОТ-ПЦР удалось обнаружить РНК вируса блютанга в первых трех разведениях (т.е. с титром вируса до $3,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). С помощью «полугнездового» варианта ПЦР можно обнаружить вирус в пяти разведениях (титр вируса $1,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) (рис. 1).

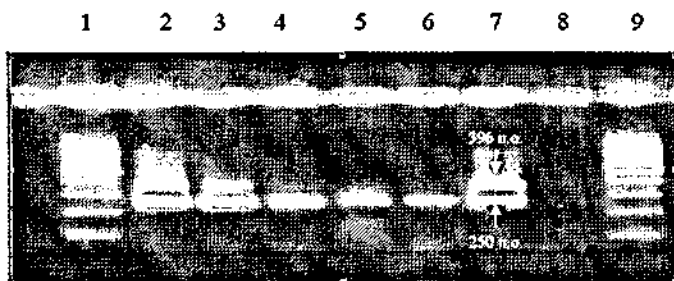


Рисунок 1. Результаты постановки «полугнездовой» ОТ-ПЦР для выявления генома вируса при разных концентрациях

Треки: 1 – маркер молекулярной массы, 2 – разведение 10^1 , 3 – разведение 10^2 , 4 – разведение 10^3 , 5 – разведение 10^4 , 6 – разведение 10^5 , 7 – K+, 8 – K-, 9 – маркер молекулярной массы.

Таким образом, при сравнении трех видов ОТ-ПЦР установлено, что чувствительность «полугнездового» варианта, разработанного на основе «стандартной» ОТ-ПЦР, была в 100 раз выше.

Для оценки специфичности различных вариантов ПЦР были использованы штаммы вируса блютанга 1, 2, 4, 8, 16 серотипов, штаммы вируса ЭГБО (New Jersey, Alberta), АЧЛ (серотипы 6, 8, 9) и болезни Ибараки (штамм Сасаки), полученные из лаборатории Музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ.

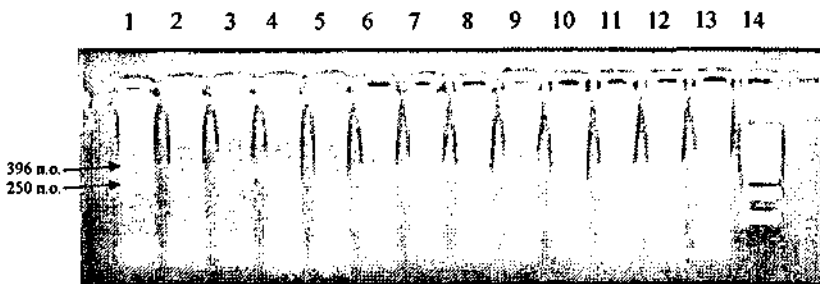


Рисунок 2. Электрофореграмма оценки специфичности «полугнездового» варианта ОТ-ПЦР

Треки: 1 – вирус блятанга 1 серотипа, 2 – вирус блятанга 2 серотипа, 3 – вирус блятанга 4 серотипа, 4 – вирус блятанга 8 серотипа, 5 – вирус блятанга 16 серотипа, 6 – вирус ЭГБО, штамм New Jersey, 7 – вирус ЭГБО, штамм Alberta, 8 – вирус АЧЛ 6 серотипа, 9 – вирус АЧЛ 8 серотипа, 10 – вирус АЧЛ 9 серотипа, 11 – вирус болезни Ибараки штамм Сасаки, 12 – интактная культура клеток, 13 – К-, 14 – маркер молекулярной массы.

При проведении сравнительных исследований чувствительности и специфичности вариантов ПЦР установили, что продукт ПЦР ожидаемого размера (250 п.о.) образуется при амплификации кДНК вируса блятанга и не образуется при амплификации кДНК гетерологичных образцов (рис.2).

3.2. Разработка ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Основными задачами этого этапа исследований являлись: подбор специфичных праймеров и олигонуклеотидных зондов, синтез кДНК, оптимизация условий постановки ПЦР в режиме реального времени, оценка специфичности и чувствительности метода.

3.2.1. Подбор праймеров и гибридизационного зонда

Для детекции использовали зонды, несущие флуорофор и тушитель, комплементарные части амплифицируемого со специфическими праймерами фрагмента (табл.2). Для подбора праймеров и зонда был выбран консервативный 5 сегмент РНК, кодирующий неструктурный белок NS1. Подбор олигонуклеотидов проводили в сравнении с известными нуклеотидными последовательностями NS1, представленными в базе данных GenBank при помощи пакета прикладных программ «Bio Edit», «Oligo 6.0».

За основу была взята методика, предложенная J.F. Toussaint и Kris De Clercq в 2007 г.

Таблица 2. Характеристика праймеров и зондов

№ п/п	Название	Последовательность олигонуклеотидов	Длина п.о.
1.	Act F	cAggTcATcAccATcggcAATg	22
2.	Act R	gcAccgTgTTggcgTAGAggTc	22
3.	Act Z	Cy 5 -cTTccTTccTgggcATggAAATccTg-BHQ2	25
4.	BTV S5 F	AgSgcTTTTTgAgAAAATAc	20
5.	BTV S5 R	TTRAATARAcAATTccTTTTTA	22
6.	BTV S5 Z	FAM-ggATTAYgcDAATgccAcgAgAA-BHQ1	23

В качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяли краситель FAM, а для тушения флуоресценции на 3' конце BHQ1. Также были подобраны праймеры на В-актин, присутствующий в крови и органах животных, который используется в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) для контроля этапа выделения нуклеиновых кислот и обратной транскрипции, где в качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда Act Z применяли краситель Cy5, для тушения – BHQ2 (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана мультиплексная реакция с использованием двух пар праймеров и зондов на разные биологические агенты в одной пробирке. Длина продукта реакции амплификации специфического участка кДНК составила 115 п.о., длина ВКО составила 160 п.о.

3.2.2. Оптимизация условий постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени При оптимизации условий постановки полимеразной цепной реакции учитывали то, чтобы наборы реагентов давали воспроизводимые результаты на ПЦР-амплификаторах, наиболее широко распространенных в областных ветлабораториях.

Эмпирическим путем отработаны температурные и временные режимы проведения реакции, подобраны буферные растворы, концентрация праймеров, ионов магния и dNTP. На приборе «IQ-5» (BioRad, США) отработан градиент температуры, начиная от 50°C до 62°C для определения наиболее оптимальной температуры отжига праймеров (рис.3).

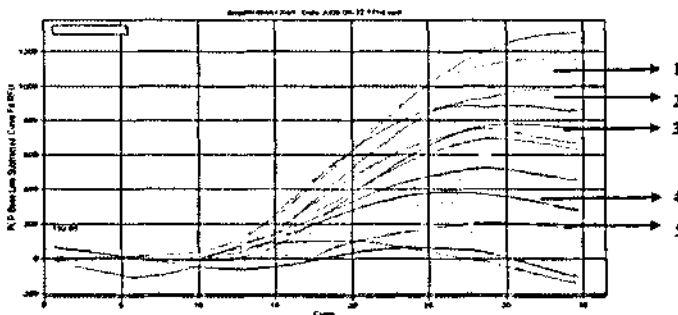


Рисунок 3. Кривые накопления продуктов ПЦР при разных температурах отжига праймеров

1-Температура отжига праймеров 50°C; 2-Температура отжига праймеров 57,7°C; 3-Температура отжига праймеров 59,9°C; 4-Температура отжига праймеров 61,3°C; 5-Температура отжига праймеров 62°C.

Было показано, что при отжиге праймеров в пределах 50°-60°C кривые накопления продуктов ПЦР имели высокий уровень флуоресценции, что свидетельствует о взаимодействии праймеров с матрицей в широком температурном диапазоне. С целью повышения специфичности реакции выбрана температура, равная 60°C. В результате проведения оптимизации реакции выбраны следующие параметры: денатурация - 95°C – 4 мин; амплификация - 95°C – 15 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 15 сек (5 циклов); амплификация - 95°C – 15 сек, 60°C – 15 сек (детекция), 72°C – 15 сек (35 циклов).

В результате титрования праймеров и зондов их оптимальная концентрация в ПЦР-смеси составила 10 пкМ и 5 пкМ соответственно. Таким образом, в состав полученной ПЦР-смеси входили следующие компоненты: 5х реакционный ПЦР буфер-5 мкл, 10 пкМ праймеры – по 1 мкл, 10 пкМ флуоресцентные зонды – по 0,5 мкл, 25 мМ MgCl₂ - 1 мкл, 25 мМ dNTP – 0,5 мкл, Taq ДНК-полимераза-1 ед., 5 мкл кДНК, деионизированная вода – до 25 мкл.

Постановку ПЦР и детекцию продуктов амплификации проводили на наиболее распространенных в России моделях оборудования: приборе «IQ5» (BioRad, США) и «Rotor gene 6000» (Corbett Research, Австралия).

Детекцию флуоресцентного сигнала проводили по двум каналам FAM (Green) и Cy5 (Red). По каналу Fam/Green вели учет результатов амплификации

специфического участка кДНК вируса блютанга (рис.4), а по каналу Cy5 (Red) – учет результатов амплификации ВКО (рис.5). Для постановки следующей реакции были взяты пробы культурального вирусосодержащего материала, полученного на культуре клеток ПСГК с титром инфекционной активности $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (рис.4), а также пробы крови от здоровых животных (рис.5):

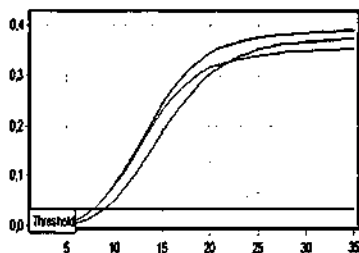


Рисунок 4. Кривые накопления продуктов амплификации специфического участка кДНК ВВ по каналу Fam (Green)

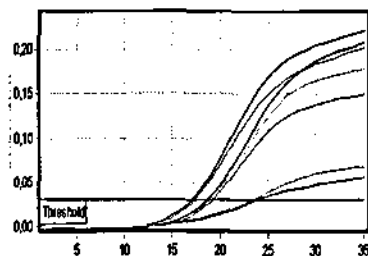


Рисунок 5. Кривые накопления продуктов амплификации ВКО по каналу Cy5 (Red)

3.2.3. Определение чувствительности и специфичности ОТ-ПЦР в режиме реального времени

При определении чувствительности ОТ-ПЦР в режиме реального времени выявили РНК вируса блютанга 8-го серотипа в пяти разведениях, предел чувствительности составил $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (рис.6).

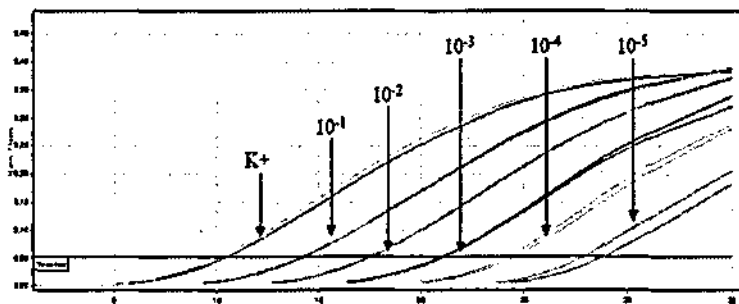


Рисунок 6. Результаты постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления генома вируса при разных концентрациях (n=3)

K+ - культуральный вирусосодержащий материал с титром инфекционной активности $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; $10^1..10^5$ - последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала.

Все значения Ct определяли только у тех флуоресцентных сигналов, которые поднимались выше флуоресцентного фона и имели вид экспоненциальных кривых. Пробы считали отрицательными, если эмиссия красителя не превышала флуоресцентного фона.

Для оценки специфичности использованы штаммы вируса блютанга 1, 2, 4, 8, 9, 16 серотипов, штаммы New Jersey, Alberta вируса ЭГБО и АЧЛ (6, 8, 9 серотипов), полученные из лаборатории Музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ.

При проведении исследований специфичности ОТ-ПЦР в режиме реального времени был специфично выявлен вирус блютанга без ложноположительных результатов.

3.3. Модификация ОТ-ПЦР в режиме реального времени с предварительной амплификацией специфического участка кДНК

Для повышения чувствительности ПЦР в режиме реального времени использовали предварительную амплификацию искомого фрагмента. Для постановки амплификации к праймеру S5 F подобран олигонуклеотид S5 Rev также на участок 5 сегмента РНК, кодирующий неструктурный белок NS1. Подбор олигонуклеотида проводили в сравнении с известными нуклеотидными последовательностями 5 сегмента, представленными в базе данных GenBank при помощи пакета прикладных программ «Bio Edit», «Oligo 6.0». Праймер S5 Rev имеет следующую последовательность 5'-TTC CCT TCG ACA TCC TCC TC-3'. Специфичность праймера была проверена с помощью интернет-сервиса BLAST. Длина синтезируемого фрагмента S5 F – S5 Rev составила 294 п.о.

После предварительной денатурации вирусной РНК в присутствии специфических праймеров S5 F – S5 Rev проводили обратную транскрипцию с последующей амплификацией на приборе «Термик МС-2», при этом применяли следующие компоненты: буфер для обратной транскрипции – 5 мкл; dNTP (25 мМ) – 0,3 мкл; Taq ДНК-полимераза- 0,1 мкл; MMLv Revertase -0,2 мкл; деионизированная вода- 3,5 мкл.

Температурные режимы амплификации: 50°C - 30 мин, 72°C-5 мин (1 цикл); 94°C - 20 сек; 58°C - 20 сек, 72°C – 20 сек (20 циклов).

Затем отбирали 10 мкл матрицы из исходной реакции и постановку ПЦР в режиме реального времени проводили на термоциклерах «IQ-5» (BioRad, США) и «Rotor gene 6000» (Corbett Research, Австралия) по схеме, указанной в разделе 3.2.2.

Для сравнения аналитической чувствительности данной методики с ранее разработанной готовили также серию десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-6}) культурального вирусосодержащего материала (рис.7).

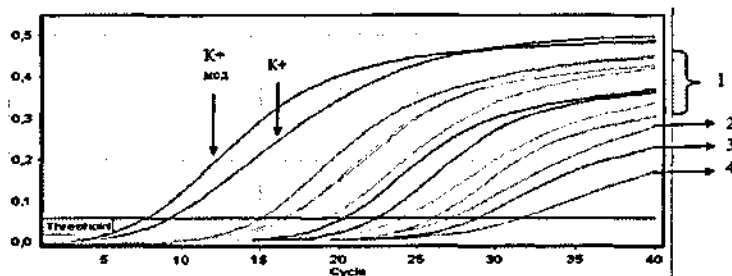


Рисунок 7. Сравнительная чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени и ее модификации (n=3)

K+ - проба культурального вирусосодержащего материала с титром инфекционной активности $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *K+ мод* - проба культурального вирусосодержащего материала с титром инфекционной активности $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, поставленная по модифицированной методике с предварительной амплификацией; 1- пробы с разведениями 10^{-1} - 10^{-4} ; 2- 10^{-5} с предварительной амплификацией; 3- 10^{-3} в режиме реального времени; 4- 10^{-6} с предварительной амплификацией.

Данная модификация ОТ-ПЦР позволяла выявлять геном вируса блютанга в шести последовательных десятикратных разведениях культурального вирусосодержащего материала (титр $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), то есть предел чувствительности составил $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что в 10 раз выше (на одно разведение больше), чем без предварительной амплификации.

3.4. Количественная оценка содержания копий специфической последовательности кДНК в пробе

Одним из достоинств ПЦР в режиме реального времени является возможность проведения не только качественного, но и количественного анализов для точного измерения количества молекул, копий специфической последовательности кДНК в пробе. Для получения стандартов кДНК, позволяющих проводить количественную

реакцию, фрагмент 5-го сегмента генома вируса блютанга клонировали в составе плазмидного вектора pDrive Cloning Vector 3,85 kb в *E. coli*.

Далее из исходного препарата плазмиды готовили серию десятикратных разведений с расчетным содержанием плазмиды от $2,25 \times 10^0$ до $2,25 \times 10^{11}$ молекул/ $0,001 \text{ см}^3$. Предельное разведение, детектируемое прибором, составило $2,25$ молекул/ $0,001 \text{ см}^3$, что составило 675 копий кДНК в 1 см^3 (рис.8).

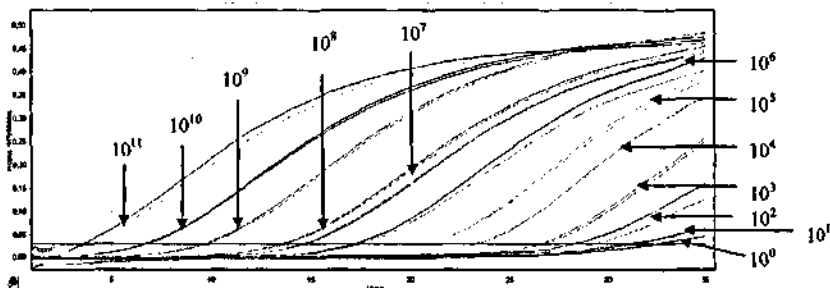


Рисунок 8. Титрование плазмиды для получения стандартов ($n=3$)

10^0-10^{11} – последовательные десятикратные разведения плазмиды.

Таким образом, полученные разведения плазмиды можно использовать в качестве стандартов при анализе образцов, что позволяет определять общее количество молекул.

Полученную рекомбинантную плазмиду можно использовать в качестве дополнительного положительного контроля на этапе постановки амплификации. Эта система является стабильной, не разрушается при многократном оттаивании.

3.5. Определение персистенции РНК вируса блютанга в пробах крови от экспериментально зараженных животных

В рамках государственного контракта № 1208/13 от 03.06.2009г. проводились исследования по изучению персистенции вируса блютанга у экспериментально зараженных животных. Материалом служили пробы крови и патологического материала от животных, экспериментально зараженных вирусом блютанга 1, 4 и 8 серотипов, отобранные в динамике согласно календарному плану, предоставленные сотрудниками лаборатории Диагностики и ОБТК.

Пробы крови от 3 групп животных.

Группа №1 – животные, инфицированные изолятом ФКл/4-09, РФ (6,0 lg ТЦД₅₀/мл) вируса блютанга 8 серотипа;

Группа №2 – животные, инфицированные вирусом блютанга 1-го серотипа, Испания, ВТВ-1 (6,5 lg ТЦД₅₀/мл);

Группа №3 – животные, инфицированные вирусом блютанга 4-го серотипа, Испания, ВТВ-4 (6,5 lg ТЦД₅₀/мл).

Согласно результатам проведенных исследований геном вируса блютанга при помощи «полугнездового» варианта ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени удалось обнаружить у телят, начиная с 3 дня после заражения и в течение 158 (теленки №848) -171 дня (теленки №846) для группы №2, зараженных 1 серотипом; для группы №3, зараженных 4 серотипом вирус обнаруживался также начиная с 3 дня в течение 139 (теленки №824) – 173 (теленки №830) дней (период наблюдения). При исследовании проб крови от овец, инфицированных ВБ, прошедшего пассажи на телятах, вирусную РНК получали, начиная с 3 дня после заражения и в течение 90 дней (период наблюдения).

3.5.1. Результаты исследований проб крови от телят, инфицированных вирусом блютанга (1, 4 и 8 серотипы), в ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для определения количественного содержания РНК вируса блютанга в организме зараженных животных брали пробы крови от телят из каждой группы. Методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени были определены значения Ct в пробах для каждого животного.

На основании проведенных исследований установлено, что геном возбудителя обнаруживается в крови, начиная с 3 суток после заражения. В течение 6-7 дней происходит накопление вируса в крови, на 7-9 день наблюдается пик вирусемии. В эти сроки обнаруживали максимальное содержание вируса в крови, значение Ct соответственно уменьшается. В дальнейшем титр вируса в крови постепенно снижается до 170 дня (период наблюдения), значение Ct при этом соответственно увеличивается (рис.9).

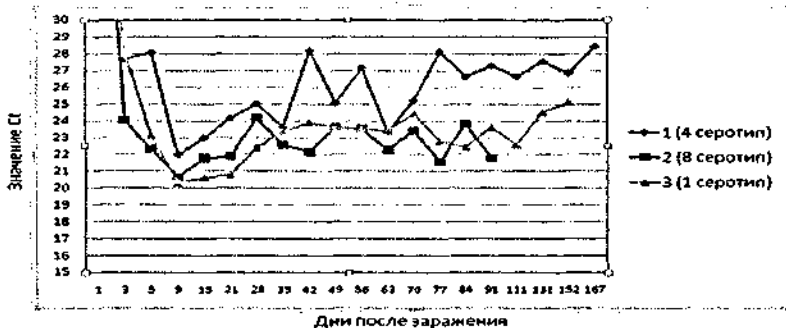


Рисунок 9. Диаграмма результатов исследований проб крови от телят, инфицированных ВБ (1, 4 и 8 серотипов), в ОТ-ПЦР в режиме реального времени (n=3)

1- теленок №830, зараженный ВБ 4 серотипа; 2- теленок №16, зараженный ВБ 8 серотипа; 3- теленок №848, зараженный ВБ 1 серотипа.

3.6. Мониторинговые исследования проб крови импортированного крупного рогатого скота на блютанг, проведенные в ГИУ ВНИИВВиМ за 2008 и 2009гг

За 2008 год исследовано всего 41 323 проб крови крупного рогатого скота, завезенного из Германии, Швейцарии, Австрии, Голландии, Дании, Белоруссии, Чехии, Венгрии. Выявлено 81 положительных результатов по хозяйствам в Курской, Белгородской, Калужской, Липецкой, Ярославской, Рязанской, Московской, Тюменской областях; Ставропольском крае; Р. Башкирия; Р. Мари-Эл. Исследования проводили утвержденными тест-системами («стандартной» и «гнездовой») ОТ-ПЦР при первичном и повторном поступлении проб.

За 2009 год исследовано 44 067 проб крови крупного рогатого скота и овец, завезенных из Венгрии, Австрии, Германии, Чехии, Голландии, Финляндии, Словакии, Монголии. Выявлено 19 положительных результатов проб крови от животных, завезенных в хозяйства Тюменской, Владимирской, Калужской областей. В качестве дополнительного метода в 2009 г. использовали разработанные «полугнездовую» ОТ-ПЦР, а также ОТ-ПЦР в режиме реального времени (табл. 3).

Таблица 3. Результаты мониторинговых исследований

Исследования за 2008г			Исследования за 2009г		
Метод исследования	Общее кол-во проб	Полож.	Метод исследования	Общее кол-во проб	Полож.
«Стандартная» ОТ-ПЦР	22114	81	«Стандартная» ОТ-ПЦР	28447	4
«Гнездовая» ОТ-ПЦР	199209	81	«Полугнездовая» ОТ-ПЦР	48	15
			Real-Time ПЦР	15620	19
			Real-Time ПЦР с предварительной амплификацией	48	19

3.7. Филогенетический анализ выделенного полевого изолята ВВ

Сотрудниками лаборатории Диагностики был получен полевой изолят 8-го серотипа (ФКл/4-09), выделенный от коровы, импортированной из Голландии в Калининградскую область (колхоз «Суворовский»). При проведении нуклеотидного секвенирования ПЦР-продукта данного изолята использовали специфические праймеры 10SF-BNNS3Rev, комплементарные 10-му сегменту вируса блютанга. Длина ПЦР-продукта составила 822 п.о.

Филогенетический анализ и построение дендрограммы, характеризующей степень гомологии исследованного участка генома, провели с использованием программ «Mega version 3.1» и «Bio Edit». Для сравнения использованы опубликованные в базе данных GenBank последовательности полноразмерного 10 сегмента генома, кодирующего белок NS3, всех имеющихся серотипов вируса блютанга (рис.10).

В результате проведенного анализа определена групповая принадлежность российского изолята вируса блютанга к группе европейских и южно-африканских изолятов, формирующих один генетический кластер 8-го серотипа данного возбудителя, процент гомологии с которыми составляет 98%.

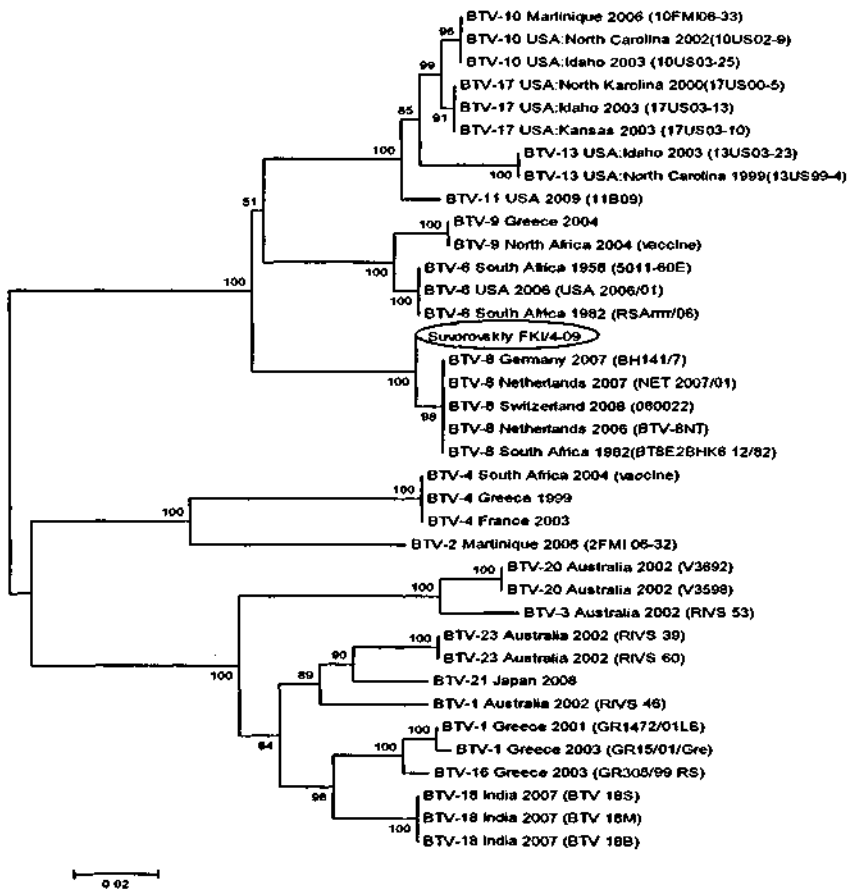


Рисунок 10. Дендрогрaмма, отражающая филогенетические отношения изолята ФК1/4-09 (Суворовский)

4. ВЫВОДЫ

1. На основе анализа банка нуклеотидных последовательностей подобраны уникальные праймеры, комплементарные участку 5 сегмента генома вируса блятанга, а также дополнительный специфический праймер, комплементарный участку 10 сегмента генома. Отработаны оптимальные условия постановки «полунестздовой» ОТ-ПЦР, позволяющей выявлять геном вируса блятанга в пробах крови и патологического материала.

2. Разработанная тест-система на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени, содержащая внутренний контрольный образец, позволяет выявлять наличие генома вируса блютанга с аналитической чувствительностью $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (675 копий кДНК/ см^3) в пробах крови больных животных, начиная с 3 суток после заражения.

3. Модифицированная методика ОТ-ПЦР в режиме реального времени с предварительной амплификацией специфического участка кДНК обеспечивает увеличение пороговой чувствительности до $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

4. Установлено, что геном вируса блютанга персистирует в организме экспериментально зараженных животных в течение 173 (КРС) и 90 (МРС) суток после заражения (период наблюдения) с пиком вирусемии, приходящимся на 7-9 сутки после заражения.

5. Установлено различными вариантами ОТ-ПЦР наличие генома вируса блютанга в пробах крови КРС, импортированных из Голландии, Германии, Швейцарии и Австрии. За период 2008-2009гг выявлено 100 положительных из 85390 проб крови.

6. По результатам филогенетического анализа изолят ФКл/4-09 (Суворовский), выделенный в ГНУ ВНИИВВиМ, имеет высокую степень гомологии (98%) с группой европейских и южно-африканских изолятов, формирующих один генетический кластер 8-го серотипа вируса блютанга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработана и утверждена Россельхознадзором (ПВР-1-5.0/02618 от 30.08.20010г.) тест-система на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени, позволяющая в короткие сроки выявлять геном вируса блютанга в пробах крови и патологического материала при проведении мониторинговых исследований.

На основании проведенных исследований разработаны, утверждены и рекомендованы для практического использования в диагностических лабораториях Российской Федерации, а также научно-исследовательских учреждениях:

1. «Методические рекомендации по выявлению генома вируса блютанга (ВВ) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» утверждены директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (28.12.2009г.). Рассмотрены и одобрены на секции «Инфекционной патологии» Отделения ветеринарной медицины РАСХН (30.09.2010г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мониторинг блютанга у животных, импортированных из стран ЕС/ С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов, А.В. Луцицин, О.Н. Жигалева, И.М. Калабеков, О.Л. Колбасова, С.П. Живодеров, А.С. Малоголовкин, Е.А. Гаврилова// Ветеринария. – 2008. - №10. – С.25-27.

2. Сравнительная оценка вариантов ПЦР-анализа для выявления генома вируса блютанга/ Е.А. Гаврилова, Д.В. Колбасов, А.С. Малоголовкин, С.Ж. Цыбанов// Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: материалы конференции молодых ученых ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. – Покров, 2009. – С. 83-87.

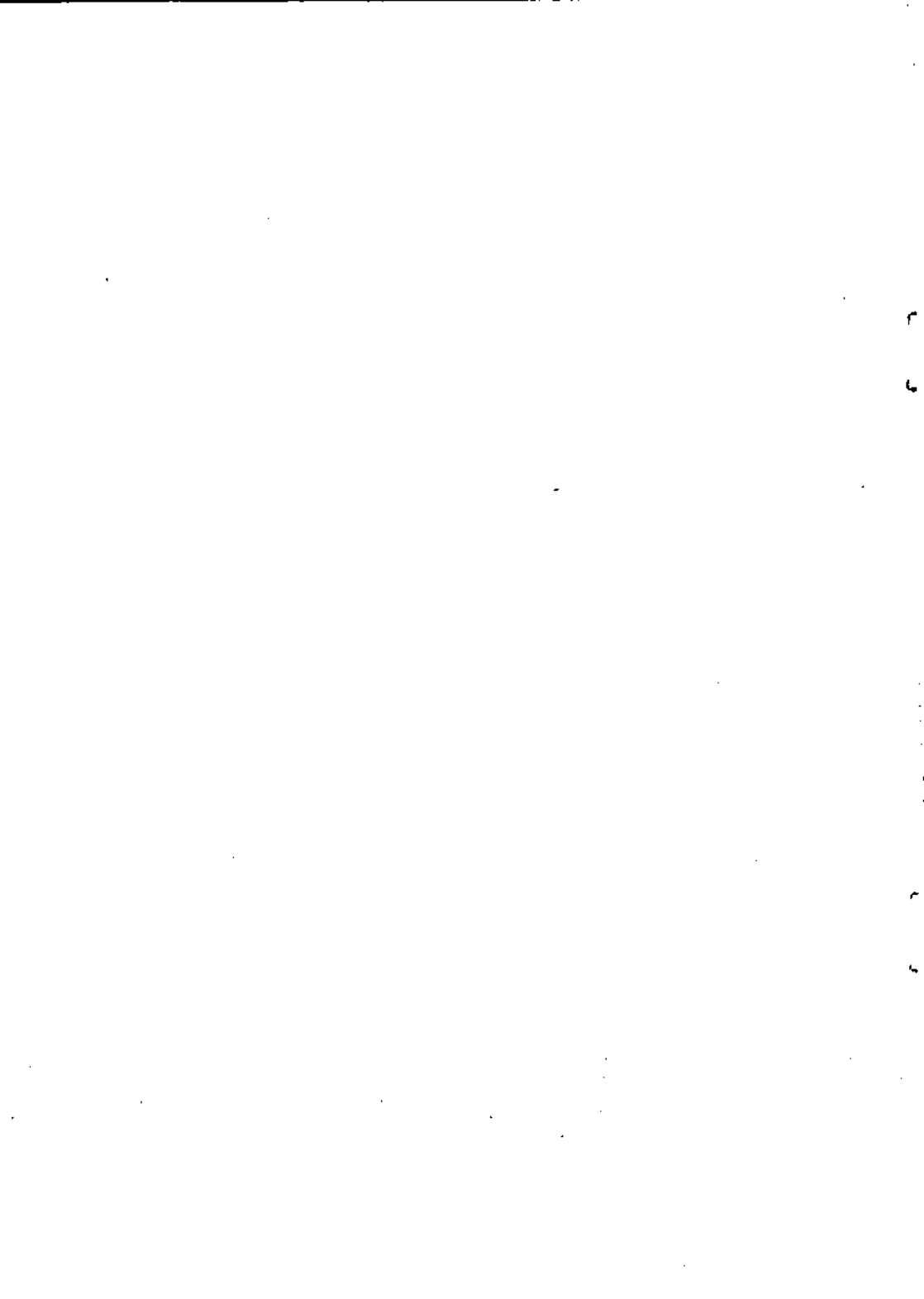
3. Сравнительная оценка различных методов выделения РНК из проб крови крупного рогатого скота для выявления генома вируса блютанга методом ОТ-ПЦР/ Е.А. Гаврилова, А.В. Панферова, А.С. Малоголовкин, А.Г. Шендрик// Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию института. – Щелково, 2009.- С. 328-332.

4. Панферова, А.В. Применение диагностических тест-систем для выявления генома вируса блютанга методом ПЦР в мониторинговых исследованиях/ А.В. Панферова, А.С. Малоголовкин, Е.А. Гаврилова// Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию института. – Щелково, 2009.- С. 301-306.

5. Monitoring and surveillance of bluetongue in Russian Federation/ D. Kolbasov, S. Tsybanov, A. Malogolovkin, A. Panfyorova, E. Gavrilova// 4th Annual meeting Epizone «Bridges to the Future».- Saint Malo, 2010.- P.189.

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии,
г. Покров Владимирской области

Тираж 80 экз.





10-23380

2010A

24480