

УДК 619:616-07.006

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР-РВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВЛКРС ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ

Н.Г. Козырева - к. б. н., ведущий науч. сотрудник
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, мультиплексная полимеразная цепная реакция, флуоресцентная детекция, диагностическая мишень, перинатальное инфицирование. **Key words:** bovine leukemia virus, multiplex polymerase chain reaction, fluorescent detection, diagnostic target, perinatal infection.



РЕФЕРАТ

В статье приводятся экспериментальные данные по молекулярной диагностике ретровирусной инфекции, индуцируемой вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) с использованием разработанной на базе ФНЦ ВИЭВ РАН тест-системы на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в формате мультиплекс.

Проведен анализ 1189 образцов крови телок из хозяйства Московской области в возрасте от 0 дней до 3 месяцев. Из них 710 животных исследовали на вирусоносительство с использованием разработанной ПЦР-РВ тест-системы в формате мультиплекс. Антитела против антигенов ВЛКРС обнаруживали методом РДП с помощью набора ФГУП Курской биофабрики (Россия) в сыворотке крови животных до приема молозива. Провирусную ДНК выделяли из 100 мкл крови с помощью наборов «ДНК-Сорб-В», «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). В качестве положительного контроля ПЦР-РВ использовали ДНК, выделенную из лиофилизированного препарата положительного контрольного антигена ВЛКРС из набора для серологической диагностики методом РДП. На этапе разработки дизайна олигонуклеотидов использовали программу OLIGO DNA/RNA primer analysis, v.4.0 (W.Rychlik, 1989) и референс-последовательность генома ВЛКРС - EF600696.

Выявлена тенденция к снижению уровня перинатальной инфицированности в обследованном хозяйстве за определенный период в 3,0 раза.

При проведении клинических испытаний обнаружено превышение в 3,2 раза относительной чувствительности методики ПЦР-РВ в формате мультиплекс по сравнению с серологическим методом (РДП) исследования молодняка до приема молозива. В процессе отработки методики на представленном материале показана возможность эффективного применения разработанных олигонуклеотидов для обнаружения ДНК ВЛКРС методом ПЦР-РВ при перинатальном заражении у телят на ранних стадиях заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота относится к злокачественным лимфопролиферативным болезням, этиологическим агентом которого является дельтаретровирус семейства Retroviridae.

Среди болезней животных лейкоз КРС представляет одну из наиболее сложных проблем ветеринарной медици-

ны. Несмотря на определенные усилия в борьбе против этого заболевания в России, лейкоз прочно занимает первое место среди инфекционных болезней КРС. В последние годы на него приходится более 50% учитываемых случаев инфекционной патологии. При проведении оздоровительных мероприятий в хозяйствах с высоким уровнем инфицирован-

Таблица 1

Программа амплификации ДНК провируса лейкоза КРС
в режиме реального времени

№ эта-па	Этап	Темпе-ратура, °С	Время		Число циклов	Сигнал флуоресценции	
			мин	сек		считывание	канал
1	Начальная денатурация	95°	15	00	1	нет	-----
2	Денатурация	95°	00	10	10	нет	-----
	Отжиг	52°	00	25		нет	-----
	Элонгация	72°	00	25		нет	-----
3	Денатурация	95°	00	10	35	нет	-----
	Отжиг	52°(*)	00	25		Детекция (*)	*FAM, JOE, ROX
	Элонгация	72°	00	25		нет	-----
4	Хранение	4	-----	-----	-----	-----	-----

Таблица 2

Схема соответствия детектируемых участков геномов
и каналов флуоресцентной детекции

Канал детекции	Диапазон длин волн (возбуждения-обнаружения), нм	Специфический фрагмент ДНК (провирусная ДНК ВЛКРС/ геномная ДНК КРС)
FAM	470-525	pol
JOE	523-564	BoLA-DRA
ROX	571-612	tax

ности выращивание свободного от вируса молодняка с последующей заменой им маточного поголовья является основным направлением работы. По статистике у инфицированных коров рождается от 3-5% до практически 30% (при наличии отягчающих условий, например, контаминация кормов плесневыми грибами, факторы патогенности микроорганизмов, нарушающих плацентарный барьер) инфицированного потомства. Циркуляция в организме телят пассивно приобретенных колостральных антител усложняет задачу своевременной постановки диагноза серологическими методами, что делает прямую диагностику инфекции в возрасте 0-6 месяцев крайне актуальной.

Выбор варианта ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) снижает риск контаминации за счет исключения стадии детекции продуктов амплификации методом электрофореза, при котором необходимо производить вскрытие пробирок – детекцию продуктов амплификации проводят непосредственно во время прохождения реакции.

Для эффективного проведения молекулярной диагностики ВЛКРС-инфекции в качестве диагностических мишеней используют консервативные участки, а также те области генома провируса, которые связаны с ранней стадией заболевания. По результатам ранее проведенного нами анализа генетического полиморфизма

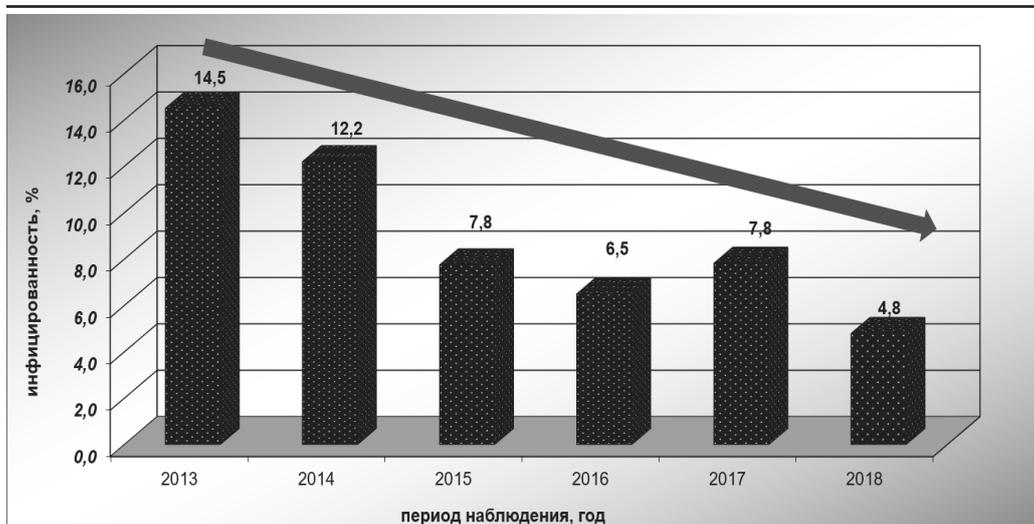


Рис. 1 Динамика выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота у молодых животных (телок)

участков генов ВЛКРС, циркулирующего на территории некоторых регионов РФ, позволил установить, что целевой фрагмент консервативного гена *pol* менее всего подвержен влиянию генетического полиморфизма и варибельность изученного участка гена *pol* ВЛКРС не превышает 3% [1-3]. По литературными данным внутри подгруппы ВЛКРС для генов *pol* расхождения в нуклеотидных последовательностях составляют менее 6%, что свидетельствует о высокой степени консерватизма штаммов вируса из различных географических регионов мира [6].

Мессенджер *tax/txh*, расположенный в регионе X генома ВЛКРС, обнаруживается в цитоплазме на ранней стадии, предшествующей накоплению других мРНК [4, 7], последовательности которого высоко консервативны между разными изолятами ВЛКРС с менее чем 5%-ой степенью вариации [5].

Цель работы: определить с помощью молекулярного метода диагностики полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на основе разработанной на базе ФНЦ ВИЭВ РАН тест-системы в формате мультиплекс уровень перинатального заражения вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) молодняка в неблагополучном хозяйстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ 1189 образцов крови телок из хозяйства Московской области в возрасте от 0 дней до 3 месяцев. Из них 710 животных исследовали на вирусоносительство с использованием разработанной ПЦР-РВ тест-системы в формате мультиплекс.

Антитела против антигенов ВЛКРС обнаруживали методом РДП с помощью набора ФГУП Курской биофабрики (Россия) в сыворотке крови животных до приема молозива.

Провирусную ДНК выделяли из 100 мкл крови с помощью наборов «ДНК-Сорб-В», «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

В качестве положительного контроля ПЦР-РВ использовали ДНК, выделенную из лиофилизированного препарата положительного контрольного антигена ВЛКРС из набора для серологической диагностики методом РДП. Препарат получен из американского штамма вируса FLK-BLV, накопленного в вируспродуцирующей культуре клеток почки эмбриона овцы (FLK).

На этапе разработки дизайна олигонуклеотидов использовали программу OLIGO DNA/RNA primer analysis, v.4.0

(W.Rychlik, 1989) и референс-последовательность генома ВЛКРС - EF600696.

Синтез олигонуклеотидов проводили стандартным способом в коммерческой организации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На базе ФНЦ ВИЭВ РАН была разработана ПЦР тест-система в режиме реального времени в формате мультиплекс (заявка на изобретение N 2018116549/10 (025779) от 04.05.2018) с использованием двух наборов сконструированных олигонуклеотидов, каждый из которых состоит из двух праймеров и одного флуоресцентного зонда, комплементарных высококонсервативной области целевого гена *pol* - P-RT-f_m/P-RT-r_m/ P-RT-z_m, фрагменту целевого гена *tax* - T/R-F1_m/ T/R-R1_m/ T/R-z1_m - одного из первых вирусных транскриптов, обнаруживаемых на ранних стадиях данной медленной инфекции, предназначенных для выявления в тканях и секретах животных (кровь, молозива, суспензии культур клеток) провирусной ДНК возбудителя при проведении диагностики лейкоза КРС на ранних стадиях заболевания методом ПЦР-РВ. Дополнительно в качестве внутреннего контроля прохождения ПЦР анализа возможно использование олигонуклеотидов, разработанных на регион Bola-DRA генома КРС [8], с предварительной модификацией и оптимизацией.

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл: 20 мкл реакционной смеси, содержащей по 10 пмоль каждого праймера, по 3 пмоль каждого зонда, 5 ед. фермента Taq-полимеразы, 10мМ дНТФ, 5х ПЦР-буфер, 15мМ MgCl₂ и 5 мкл ДНК пробы.

Аmplификацию осуществляли на флуоресцентном ПЦР-детекторе для проведения ПЦР-РВ с планшетным форматом реакционного модуля по соответствующей программе (таблица 1) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующим каналам (таблица 2).

В качестве контрольных образцов (КО) использовали: а) отрицательный контроль этапа выделения (ОК) – 100 мкл

дистиллированной воды; б) отрицательный контроль этапа ПЦР (К-) – 5 мкл дистиллированной воды; в) положительный контроль этапа ПЦР (ПК) – 5 мкл ДНК FLK-BLV.

При исследовании 750 образцов ДНК, выделенных из крови животных в возрасте до 3 месяцев, выявили 48 положительных пробы, что составляет 6,4%.

В процессе обследования молодняка в хозяйстве за период с 2013 г. по июнь 2018 г. в динамике методом ПЦР-РВ выявлена тенденция к снижению перинатальной инфицированности с 14,5% до 4,8% (рис.1).

Обнаружено, что уровень перинатальной инфицированности при серологическом исследовании молодняка до приема молозива составлял 2%. Кроме того, отсутствие иммуноглобулинов сыворотки крови приводит к быстрой контаминации биоматериала и образованию колоний микроорганизмов в геле агара, что препятствует правильному учету результатов реакции и снижает чувствительность метода. Помимо этого, необходимость взятия материала у новорожденных телят до приема молозива создает дополнительные трудности в работе зооветеринарного персонала.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности использования разработанных олигонуклеотидов для обнаружения ДНК ВЛКРС методом ПЦР-РВ.

Определен уровень перинатального заражения молодняка в неблагополучном хозяйстве, который составляет 6,4%.

Выявлена тенденция к снижению уровня перинатальной инфицированности в обследованном хозяйстве за определенный период в 3,0 раза.

При проведении клинических испытаний обнаружено превышение в 3,2 раза относительной чувствительности методики ПЦР-РВ в формате мультиплекс по сравнению с серологическим методом (РДП) исследования молодняка до приема молозива.

Получены экспериментальные данные

по совершенствованию оздоровительных мероприятий у молодняка крупного рогатого скота с применением ПЦР-РВ в возрасте 0-20 дней для диагностики перинатального заражения при ретровирусной инфекции.

Финансирование: данная работа выполнена в рамках программы проведения фундаментальных научных исследований ГАН на 2013-2020 годы, пункт 160. Молекулярно-биологические и нанобиотехнологические методы создания биопрепаратов нового поколения, технологии и способы их применения с целью борьбы с особо опасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных по теме 0578-2014-0005 «Разработать способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени».

THE USE OF MULTIPLEX PCR-RT IN MOLECULAR DIAGNOSTICS OF BLV AT PERINATAL INFECTION

Kozyreva N.G. – C. B.Sc., leading researcher, Federal State Budgetary Research Institution «Federal Scientific Center - All-Russian Scientific Research Institute Of Experimental Veterinary Of The Russian Academy Of Sciences».

ABSTRACT

The article presents experimental data on the molecular diagnostics of retroviral infection induced by the bovine leukemia virus using the PCR test system developed on the basis of the VIEV RAS multiplex PCR-RT. Circulation of passively acquired colostrum antibodies in the body of calves complicates the task of timely diagnosis by serological methods, what makes direct diagnosis of infection at the age of 0-6 months extremely urgent. Based on the results of studies to determine the level of perinatal infection of calves in the dynamics, as part of the implementation and improvement of the scheme of preventive activities in the surveyed farm of the Moscow Region, a tendency to its reduction in 3 times revealed. Using the developed diagnostic test among 710 animals under 3 months of age, the proportion of calves-virus carriers was 6.4%. The possibility of effective

application of the developed oligonucleotides for DNA detection of BLV by the PCR-RT method for perinatal infection in calves in the early stages of the disease shows in the process of working out the technique on the presented material.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козырева, Н.Г. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации / Н.Г. Козырева, М.И. Гулюкин // Ветеринария Кубани. – 2017. – № 6. – С. 4-9.
2. Определение генетического статуса изолятов ВЛКРС, распространенных на территории Московской области ЦФО РФ / Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова, Т.В. Степанова, М.И. Гулюкин // Материалы IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Молекулярная диагностика 2017». – Москва, 2017. – Т.2. – С. 394-395.
3. Филогенетический анализ участка гена *pol* изолятов провируса лейкоза КРС, обнаруженных у животных из различных хозяйств регионов Российской Федерации / Н.Г. Козырева, М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, А.С. Малоголовкин, А.И. Клименко, В.В. Разумовская // Доклады РАСХН. – 2011. – № 6. – С. 48-51.
4. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm / M. Jimba, S.-N. Takeshima, K. Matoba, D. Endoh, Y. Aida // J. Retrovirol. – 2010. – Vol. 7. – P. 91.– Режим доступа: <http://www.retrovirology.com/content/7/1/91>. DOI:10.1186/1742-4690-7-91.
5. Choi, E.A. Mutational analysis of bovine leukemia virus Rex: identification of a dominant-negative inhibitor / E.A. Choi, T.J. Hope // J. Virol. 2005. – Vol. 79. – P. 7172-7181.
6. Haas, L. Bovine leukemia virus gene expression in vivo / L. Haas, T. Divers, J.W. Casey // J. Virol. – 1992. – Vol. 66. – P. 6223-6225.
7. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel

anti-retroviral therapies in human / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A.-B. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, L. Willems // J. Retrovirol. – 2007. – Vol. 4. – P. 32. – Режим доступа: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-4-18>. DOI: 10.1186/1742-4690-4-18.

8. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi, Sh.-N. Takeshima // Front. Microbiol. – 2013. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328>.

УДК 619: 616-036.22

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ МОНИТОРИНГА СКРЫТЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА

А.А.Шабейкин-к.в.н., ведущий научный сотрудник, А.В.Паршикова, научный сотрудник, А.М. Гулюкин-к.б.н., ведущий научный сотрудник, А.В.Капустин- к.в.н., ведущий научный сотрудник, А.И.Лаишевцев-старший научный сотрудник, Т.В.Степанова- старший научный сотрудник, Ю.Г.Исаев-к.б.н., ведущий научный сотрудник, С.В.Лопунов-к.в.н., докторант, И.А.Гулюкина- аспирант
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Ключевые слова: скрытые инфекции, эпизоотологический мониторинг, болезни мелких домашних животных, мегаполис. **Key words:** asymptomatic infections, epidemiological monitoring, diseases of companion animals, metropolis.



РЕФЕРАТ

При проведении мониторинга скрытых инфекций мелких домашних животных в условиях мегаполиса традиционно используемые дескриптивные методы не позволяют получить представление о реальной эпизоотической ситуации. Разрозненность первичных данных о случаях заболеваний животных в государственных и частных клиниках, разнообразие применяемых методов лабораторной диагностики, пропуск подавляющего числа субклинических случаев болезни в ходе общеврачебной практики ведет к гетероскедастичности наблюдений и формированию ложных заключений об эпизоотической ситуации и недооценке существующих проблем. В условиях мегаполисов и городских агломераций эффективность проведения мониторинга и анализа эпизоотологической ситуации значительно повышается при планировании и проведении исследований с использованием вероятностных методов. Формирование репрезентативных выборок по количеству и способу отбора животных, сбор проб «гроздьями» в разных районах города, систематический принцип исследования и одновременная стандартизация лабораторной диагностики позволяют дать заключение по эпизоотической обстановке в различных территориальных участках и проследить временную динамику развития эпизоотической ситуации. В условиях отсутствия направленных ветеринарных мероприятий скрытые инфекции могут получить широкое распространение в мегаполисе, что является закономерным явлением, учитывая общую большую численность и большую плотность популяций мелких домашних животных. Для условий Московского региона наибольшую опасность представляют возбудитель бруцеллеза собак *Brucella canis*, вирусы лейкемии (FeLV)