

*Нурабаев С.Ш., Строчков В.М., Кошеметов Ж.К., Нургазиев Р.З.*

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА ЛОШАДЕЙ**

*S.Sh. Nurabaev, V.M. Strochkov, Zh.K. Koshemetov, R.Z. Nurgaziev*

**MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSIS AND VIRUS TYPING EQUINE INFLUENZA**

УДК: 619:616-07/619.3

*Разработаны тест-системы на основе ОТ-ПЦР для идентификации и типирования субтипов H3 и H7 вируса гриппа лошадей в образцах биологического происхождения.*

**Ключевые слова:** *грипп лошадей, полимеразная цепная реакция, диагностика.*

*Developed test sistemf based on RT-PCR for identification and typing of subtype H3 and H7 influenza virus of horses in biological samples.*

**Key words:** *influenza horses, polymerase chain reaction diagnosis.*

Гриппозная инфекция остаётся серьёзной проблемой для коневодства, вызывая массовые вспышки респираторных заболеваний лошадей во всём мире. Заболевание наносит существенный ущерб коневодству вследствие снижения племенной и спортивной ценности переболевших животных, затрат на лечение, карантинных мероприятий, срыва планов спортивных соревнований и других экономически значимых причин [1, 2].

Быстрое распространение и высокая изменчивость гриппа лошадей оказали негативное влияние на коневодство во всем мире. Это было подтверждено в течение 2007-2008 годов, когда грипп лошадей прокатился по соседним странам России, Китаю, Монголии, а также Индии, Японии и Австралии [3, 4, 5, 6].

В настоящее время грипп лошадей рассматривают как трансграничное заболевание, в связи с чем для Республики Казахстан важна ситуация с этой болезнью в сопредельных государствах. Поэтому разработка современных высокотехнологичных тест-систем для экспресс-диагностики данной инфекции необходима для эффективной борьбы с распространением гриппа лошадей.

Для быстрого определения последовательности сайта расщепления гемагглютинина, маркера потенциала вирулентности вирусов гриппа лошадей, необходимо использование ПЦР (полимеразная цепная реакция). Эта методика в сочетании с сиквенсом сайта расщепления гемагглютинина может служить в качестве быстрого и чувствительного метода для оценки потенциальной вирулентности вируса гриппа

лошадей. Достоинствами метода ПЦР являются высокая специфичность, чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, возможность выявления сразу нескольких патогенов в одной пробирке, при условии наличия в реакционной смеси нескольких пар соответствующих праймеров. Метод ПЦР позволяет работать с любым исходным патматериалом без выделения возбудителя в чистом виде [7, 8, 9, 10, 11].

**Целью данного исследования** являлась разработка диагностических тест-систем на основе ОТ-ПЦР для идентификации вируса гриппа лошадей (ВГЛ) субтипов H3 и H7.

**Материалы и методы**

**Вирусы.** В работе использовали следующие штаммы вируса гриппа:

- штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>) ВГЛ;
- штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H<sub>3</sub>N<sub>8</sub>) ВГЛ;
- штамм NIBRG-121 XP (H1N1) вируса гриппа свиней (ВГС);
- штамм А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) вируса гриппа птиц (ВГП);
- штамм А/крачка/Южная Африка/61 (H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>) ВГП;
- штамм А/Turkey/Massachusetts/3740/65 (H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) ВГП.

Вирус болезни Ньюкасла.

**Выделение РНК** из очищенных препаратов вируса проводили с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit фирмы QIAGEN в соответствии с наставлением по применению данного набора.

**Поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вируса гриппа лошадей.**

Поиск нуклеотидных последовательностей ВГЛ проводили на сайте NCBI – Influenza Virus Resource (Information, Search and Analysis).

Анализ и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью приложения пакета прикладных программ "Fast PCR" и "Bio Edit".

**Подбор праймеров.** Олигонуклеотидные праймеры, используемые для выявления ВГЛ и типирования гена НА подбирали с помощью *on line* программы "Primer3", а также приложения "Primer Express-v2.0". Характеристики праймеров устанавливали с помощью программы "Oligo Analyses".

Важнейшая характеристика праймеров - температура плавления (Tm) отжига, для её расчета использовали упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера:  $Tm = [(A+T) \times 2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}]$

ПЦР проводили в амплификаторе «Mastercycler epgradientS» фирмы Eppendorf, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, с точностью не менее 0,1°C.

Обратную транскрипцию проводили с использованием "oligo (dT)<sub>18</sub>" (50 мкМ) и непосредственно амплификацию к ДНК вирусных генов проводили с использованием подобранных праймеров.

Результаты продукта амплификации оценивали при помощи электрофореза в 2,0% агарозном геле. Использовали маркеры молекулярных весов SERVA DNA Standard pBR 328 Mix.

**Результаты и обсуждение**

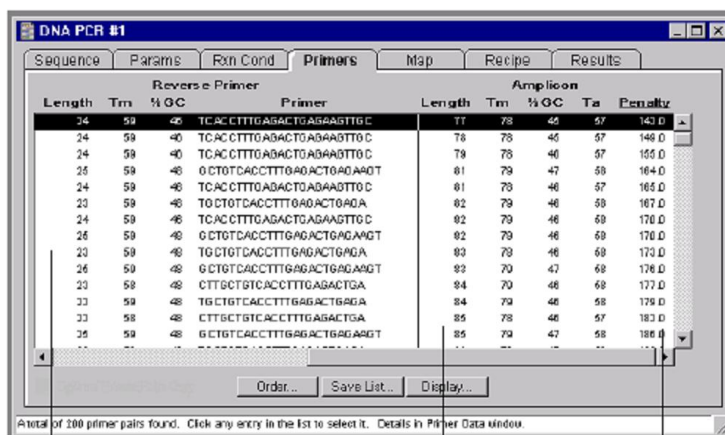
К настоящему времени хорошо известно, что геном ВГЛ типа А представлен восемью фрагментами, которые защищены нуклеокапсидным белком.

Для разработки любого ПЦР - протокола необходимы знания о нуклеотидных последовательностях (н.п.) изучаемого возбудителя. Для анализа и поиска н.п. сегментов ВГЛ использовали базу данных *GenBank*. В результате установлено, что к настоящему времени банк генов содержит достаточное количество полных нуклеотидных последовательностей вируса гриппа, из них более 4000 принадлежат ВГЛ.

Для идентификации вируса гриппа лошадей подтипов H<sub>3</sub>N<sub>8</sub> и H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> методом ПЦР в качестве мишени нами был выбран ген гемагглютинаина (НА-ген) ВГЛ. Поиск в базе Ген - банка показал наличие 2993 полных н.п. данного гена ВГЛ. Множественное выравнивание последовательностей НА-гена позволило установить, что гомология между типами А, В и С равняется 24-39%, а внутри типа А 91-100%, что

говорит о консервативности гена внутри типа и высокой изменчивости его между типами вируса гриппа. Это даёт возможность для получения праймеров и зондов, которые будут специфичны консервативной последовательности НА-гена ВГЛ, и в тоже время не будут перекрываться с последовательностями НА-генов других типов вируса гриппа.

При разработке метода ПЦР для идентификации ВГЛ в качестве матрицы для конструирования специфических праймеров использовали последовательность гена гемагглютинаина.



Primer pane

Amplicon data

В результате подбора олигонуклеотидов было сгенерировано более 20 пар праймеров на участок НА - гена каждого субтипа ВГЛ. Отсутствие гомологии с другими вирусами семейства Orthomyxoviridae и с другими подтипами вируса гриппа А являлось основным критерием отбора олигонуклеотидов (рис. 1).

**Рис. 1.** Подбор олигонуклеотидных последовательностей с использованием пакета прикладных программ Primer Express-v2\_0.

Предварительный отбор проводили по основным критериям, предъявляемым для праймеров. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, иметь допустимое процентное соотношение GC-оснований – 40-60%, температуру плавления и прогнозируемый размер ПЦР-продукта, находящийся в пределах 150-400п.н. Последовательности предварительно отобранных пар праймеров представлены в табл. 1.

**Таблица №1 - Комбинации различных пар праймеров на участок НА-гена ВГЛ**

Праймеры на ген НА субтипа Н <sub>7</sub> ВГЛ		
№	Forward Primer	Reverse Primer
1	TGCCCCAAGCCCTGGACCAA	AAACTGGCGCGGTCAGGTGC
2	GCCTAGGACATCATGCTGTG	GTTTCTAATGCTGGCCATGC
3	TGGAACCAAAGTAGACACCC	GTTTCTAATGCTGGCCATGC
4	ATTAGCCACTTCGGCATTCC	GTCAGGTGCTATAAAGGCC
5	CATATACCGGAGTGAGAACC	CAGATTATCAGAGCTGGCTC
6	CAGGATCAACCGCTGAACAGA	TCAGGTGCTATAAAGGCCCA

Праймеры на ген НА субтипа Н <sub>3</sub> ВГЛ		
№	Forward Primer	Reverse Primer
1	AGCAAAAAGCAGGGGATATTTTC	GCTATTGCTCCAAAAGATTC
2	CGGAATTCAGCAAAAAGCAGG	GCTCTAGAAGTAGAAAACA
3	GAAGCATCCCCAACGACAAAACC	GGCGAATGAAATCCACAGTATCC
4	GCATCTCCAACGACAAGCCAT	ATCGGAACCCATACCACCCAT
5	AATGCTAGGAGACCCCCACTGT	GGCTCCACTTCTTCCGTTTTG
6	GCAGCAGTTCCTTCTCCTTG	CAAGGAGAAGGAAGTCTGTC

После этого каждая последовательность подвергалась анализу на шпилькообразование (рис. 2).

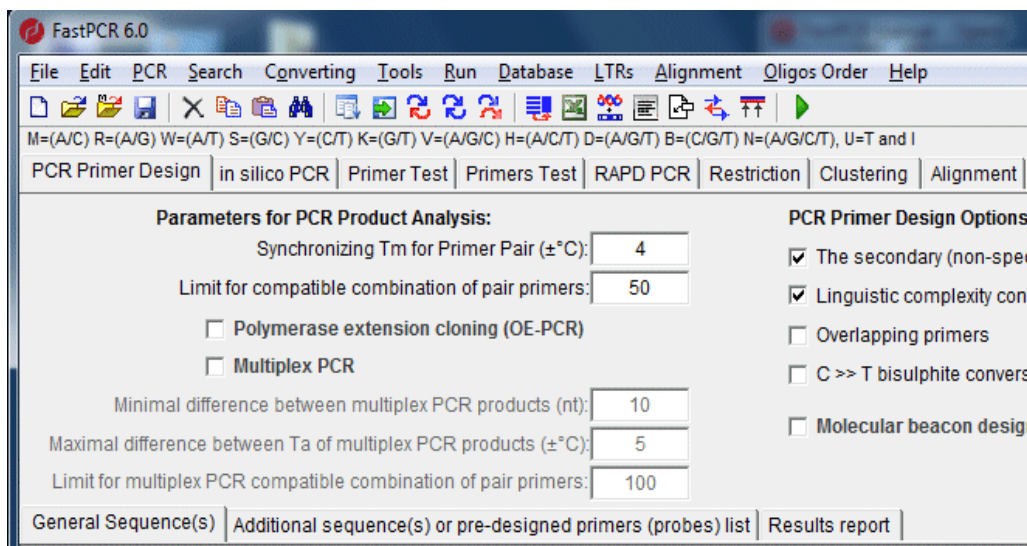


Рис. 2 Проверка олигонуклеотидных последовательностей к образованию димера и шпильки с использованием пакета прикладных программ FastPCR 6.0.

Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону, отжига праймеров происходить не будет, и как следствие - ложноотрицательный результат.

При отборе праймеров особое внимание уделялось их локализации на гене. Последовательность олигонуклеотида необходимо было располагать на участках гена НА. Результаты этих поисков представлены на рис. 3.

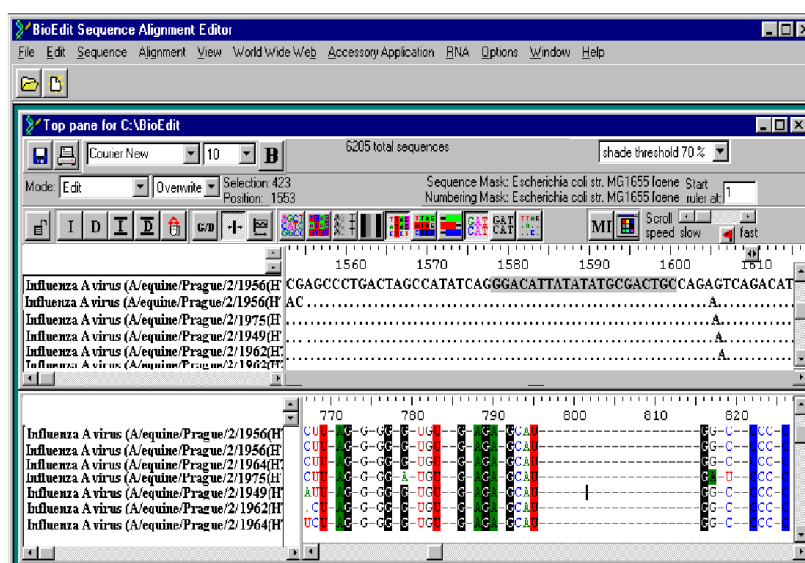


Рис.3 Выравнивание и определение расположения олигонуклеотида в участках гена НА с использованием пакета прикладных программ BioEdit version 5.0.6.

Таким образом, после предварительного отбора для каждого субтипа ВГЛ выбор пал только на две пары праймеров для каждого субтипа, как наиболее подходящие для постановки ОТ-ПЦР. Нуклеотидная последовательность и их основные характеристики представлены в табл. 2.

**Таблица №2 - Основные характеристики специфических праймеров для постановки ОТ-ПЦР на грипп лошадей**

№	Последовательность (5'-3')	поз. на геноме	Tm, °C	GC,%
Праймеры на ген НА субтипа Н7 ВГЛ				
1	TGCCCCAAGCCCTGGACCAA	666	60,0	65,0
	AAACTGGCGCGGTCAAGTGC	784	60,0	65,0
2	CAGGATCAACCGCTGAACAGA	602	60,0	52,0
	TCAGGTGCTATAAAGGCCCCA	812	60,0	
Праймеры на ген НА субтипа Н3 ВГЛ				
1	GCATCTCCAACGACAAGCCAT	905	61,0	52,0
	ATCGGAACCCATACCACCCAT	1108	61,0	52,0
2	AATGCTAGGAGACCCCCACTGT	252	60,0	55,0
	GGCTCCACTTCTCCGTTTTG	459	60,0	52,0

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью специальных приборов - ДНК-синтезаторов. Синтез праймера проводили поэтапным достраиванием нуклеотида, согласно его нуклеотидной последовательности.

Таким образом, в результате проведенных исследований был проведен поиск полных нуклеотидных последовательностей НА-гена штаммов и изолятов вируса гриппа типов А, В и С. Проведен сравнительный анализ и множественное выравнивание полных нуклеотидных последовательностей НА-гена штаммов и изолятов вируса гриппа. И на основе анализа последовательностей НА-гена ВГЛ, с использованием программы «Primer Express 2.0», подобраны праймеры для специфического выявления субтипов Н3 и Н7 ВГЛ. Так же произведен синтез специфических праймеров в необходимом количестве на синтезаторе олигонуклеотидов "Expedite 8909" ("Applied Biosystems", США), согласно протоколам производителя.

Эффективность метода ПЦР и его специфичность зависит от многих параметров, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим амплификации, концентрацию фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, концентрацию праймеров. В результате проведенных опытов, для амплификации специфического ПЦР продукта при идентификации субтипов Н3 и Н7 ВГЛ, был подобран оптимальный состав реакционной смеси, который представлен в табл. 3.

**Таблица № 3 - Состав реакционной смеси для постановки ПЦР**

№	Состав реакционной смеси	Конц.	Сток	50мкл/1проба
1	Buffer (200mM Tris-HCL pH=8.4, 500mM KCL, 25mM MgCL <sub>2</sub> )	1x	10x	5
2	dNTP's (10mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.2mM	10mM	1
3	Forward Primer1 (10 pM)	0.1µM	10µM	2
4	Reverse Primer 2 (10 pM)	0.1µM	10µM	2
5	Tag-polymerase (5000 units/ml)	0.05u/µl	5u/µl	1
6	cDNA	x	x	1
7	DEPC-treated H <sub>2</sub> O		mQ	38

В качестве положительного контроля использовали контрольный образец РНК, сертифицированный для вирусов типа А.

Анализ ПЦР-продукта проводили в 2% агарозном геле в присутствии этидия бромид. В лунки наносили по 10 мкл исследуемого материала. Электрофорез проводили непосредственно в ТБЕ буфере.

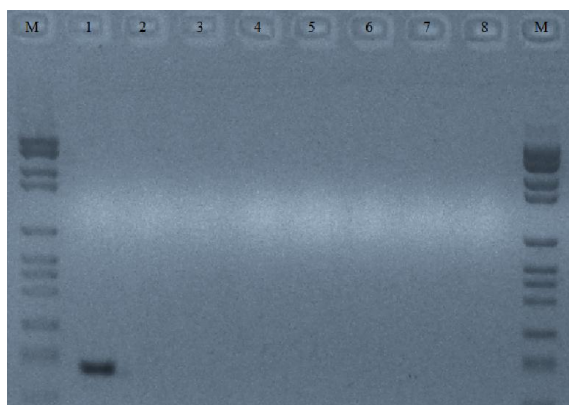
В результате проведенных исследований также были подобраны оптимальные температурно-временные режимы наработки ПЦР продукта, характерного только для возбудителя гриппа лошадей субтипов Н7 и Н3 и имеющие четко выраженные полосы кДНК в агарозном геле. Для наработки кДНК использовали следующие температурно-временные режимы, представленные в табл. 4.

**Таблица №4 - Рекомендуемый режим программы амплификации для обнаружения гемагглютиниνα вируса гриппа лошадей, субтипов H3 и H7**

Режим	Температура	Время	Число циклов
Начальная денатурация	94°C	2 мин	25 циклов
Денатурация	94°C	15 сек	
Отжиг	57°C	15 сек	
Элонгация	72°C	45 сек	
Завершающая элонгация	72°C	5 мин	

Проведенные исследования по подбору оптимальных реакционных смесей для синтеза кДНК и постановки ПЦР, а также условиям температурного режима и времени амплификации показали, что при использовании данного метода происходит наработка ПЦР продукта размером не менее 210 п.н., характерного для субтипа H7 и 207 п.н. для субтипа H3 ВГЛ.

Для проверки специфичности разработанной ОТ-ПЦР при идентификации субтипа H7 в качестве положительного контроля использовали штамм А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, а в качестве отрицательного - воду и гетерологичные пробы (штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, штаммы А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3), А/Turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2) и А/домашний/ гусь/ Павлодар/1/05 (H5N1) ВГП, штамм NIBRG-121XP (H1N1) ВГС, вирус болезни Ньюкасла (ВБН). Результаты данных исследований представлены на рис. 4.

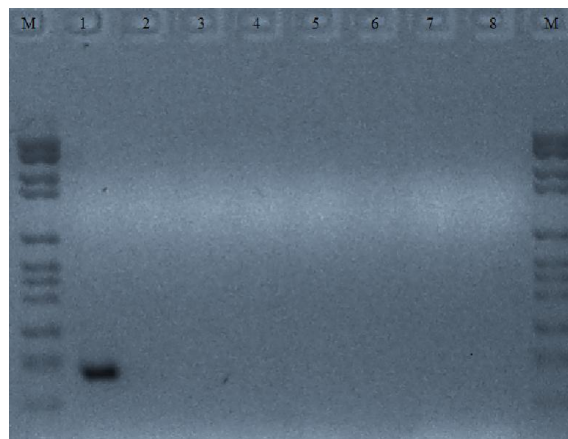


М – маркер ДНК, 1 – РНК шт. А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, 2 – РНК шт. А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, 3 – РНК шт. А/Turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2) ВГП, 4 - РНК ВБН, 5 –РНК шт. А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) ВГП, 6- РНК шт. NIBRG-121XP (H1N1) ВГС, 7-РНК шт. А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) ВГП, 8- вода.

**Рис.4** Определение специфичности метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа H7 ВГЛ.

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, отработанный метод ОТ-ПЦР позволяет специфически выявлять НА субтипа H7 ВГЛ в искомой пробе и не даёт перекрёстных реакций с гетерологичными пробами, а также отсутствует полоса кДНК в пробе с водой.

Для проверки специфичности разработанной ОТ-ПЦР для идентификации субтипа H3 ВГЛ в качестве положительного контроля использовали штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, а в качестве отрицательного - воду и гетерологичные пробы, используемые при постановке ОТ-ПЦР при субтипе H7. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 5.

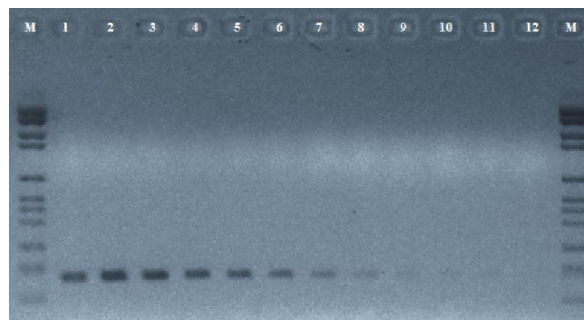


М – маркер ДНК, 1 – РНК шт. А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, 2- РНК шт. А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, 3 – РНК шт. А/Turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2) ВГП, 4 - РНК ВБН, 5 –РНК шт. А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) ВГП, 6- РНК шт. NIBRG-121XP (H1N1) ВГС, 7-РНК шт. А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) ВГП, 8- вода.

**Рис. 5** Определение специфичности метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа H3 ВГЛ.

Как видно из данных, представленных на рисунке 5, разработанный метод ОТ-ПЦР позволяет специфически выявлять субтип H3 ВГЛ в искомой пробе и не даёт перекрёстных реакций со штаммом А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, пробами ВГ типа А, ВБН, а также регистрировалась отрицательная реакция в пробе с водой.

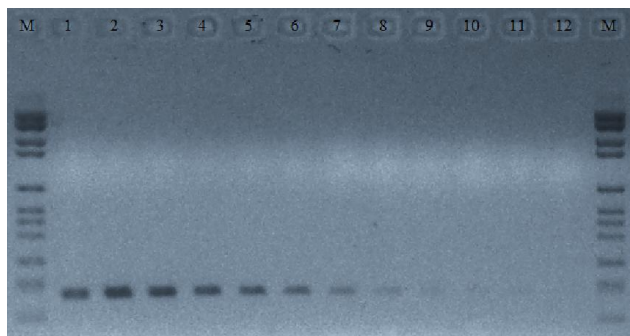
Следующим этапом наших исследований было определение порога чувствительности разработанного метода ПЦР для субтипов H7 и H3. С этой целью синтезированную кДНК с концентрацией 82 нг/мкл разводили в 10-ти кратных разведениях до концентрации 0,0082 - 0,00082 пг. Результаты этих исследований представлены на рис. 6 и 7.



М –маркер; 1- 82 нг; 2 -8.2 нг; 3 - 820 пг; 4 -82 пг; 5 - 8,2 пг; 6- 0,82 пг; 7 - 0,082 пг; 8 - 0,0082 пг; 9-12 – негатив контроль.

**Рис.6** Определение чувствительности метода ПЦР при идентификации субтипа H7 ВГЛ





М –маркер; 1- 82 нг; 2 -8,2 нг; 3 - 820 пг; 4 -82 пг; 5 - 8,2 пг; 6- 0,82 пг; 7 - 0,082 пг; 8 - 0,0082 пг; 9-0,00082 пг; 10-12 – негатив контроль

**Рис. 7** Определение чувствительности метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа Н<sub>3</sub> ВГЛ.

Полученные результаты показали, что при определении чувствительности разработанного метода ПЦР установлено, что данный метод позволяет выявлять кДНК к субтипу Н<sub>7</sub> ВГЛ в исследуемой пробе в концентрации до 0,082 пг, а к субтипу Н<sub>3</sub> до 0,0082 пг.

Таким образом, в результате приведенных исследований, по разработке метода ОТ-ПЦР для идентификации и типирования субтипов Н<sub>7</sub> и Н<sub>3</sub> ВГЛ, были подобраны оптимальные условия постановки реакции амплификации и специфические праймеры, позволяющие нарабатывать ПЦР-продукт размером не менее 210 п.н., характерный для субтипа Н<sub>7</sub> и 207 п.н. для субтипа Н<sub>3</sub> ВГЛ. Подобранные синтетические олигонуклеотидные праймеры для выявления субтипов Н<sub>7</sub> и Н<sub>3</sub> вируса гриппа лошадей показали высокую специфичность, чувствительность и пригодны для применения по идентификации гемагглютинина вируса гриппа лошадей в различных клинических образцах.

Предложенный метод диагностики ВГЛ методом ОТ-ПЦР является высокочувствительным и специфичным к субтипам Н<sub>7</sub> и Н<sub>3</sub> и позволяет достоверно определять наличие РНК ВГЛ данных субтипов в биологических пробах без предварительного подрачивания тестируемого вируса, метод может быть использован для экспресс-идентификации.

#### Заключение

Разработаны тест-системы на основе ОТ-ПЦР, для диагностики вируса гриппа лошадей субтипов Н<sub>7</sub> и Н<sub>3</sub>, которые позволяют специфично выявлять возбудителя болезни в любом клиническом материале. Проведенные исследования послужили основой нового алгоритма лабораторной диагностики ВГЛ. Разработанные тест-системы на основе ОТ-ПЦР, для диагностики вируса гриппа лошадей субтипов Н<sub>7</sub> и Н<sub>3</sub>, является конкурентно способными аналогичным тест-системам зарубежных производителей.

#### Список литературы:

1. Гендон Ю.З. Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? // *Вопр. вирусологии* - 1998. - №1. - С. 43-46.
2. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E. et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States // *JAMA*, 2003, V. 289, P. 179.
3. Virmani, N., Singh, BK, Gulati, BR, Kumar, S., 2008. Equine influenza outbreak in India. *Vet.Rec.* 163, 607–608.
4. Yamanaka, T., Niwa, H., Tsujimura, K., Kondo, 2008a. Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *J. Vet.. Med. Sci.*
5. Sakoda, Y., Kida, H., 2008. Genetic analyses of an H3N8 influenza virus isolate causative strain of the outbreak of equine influenza at the Kanazawa racecourse in Japan in 2007. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 899–906.
6. Bryant, N.A., - of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. (2011) *Veterinary - Microbiology*, 147 (1-2), pp. 19-27.
7. Fouchier, RA., Bestebroer, TM, Herfst, S. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. // *J. Clin. Microbiol.* AD, 2000.
8. Сандыбаев Н.Т. Изучение полной нуклеотидной последовательности вируса гриппа птиц (H5N1), выделенного в Павлодарской области Республики Казахстан Н.Т. Сандыбаев, Е.В. Жолдыбаева, К.Т. Султанкулова, В.Л. Зайцев, В.М. Строчков, Н.Ж. Тулеуова, С.М. Мамадалиев. // *Биотехнология. Теория и практика*, 2007, №3, -С. 95-99.
9. Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. [Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR.](#) *J Clin Microbiol* 2007, 45(2):600-603.
10. Tudor S.E. Devel- Devel- opment and evaluation of one-step Taq Man real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix, and hemagglutinin genes of equine influenza virus.//*J.Clin. Microbiol.*47,3907–3913.UB, 2009.
11. Muradrasoli S, Mohamed N, Belak S, Czifra G, Herrmann B, Berencsi G, Blomberg. [Broadly targeted triplex real-time PCR detection of influenza A, B and C viruses based on the nucleoprotein gene and a novel "MegaBeacon" probe strategy.](#) *J.J Virol Methods.* 2010 Feb;163(2):313-22.

Рецензент: к.биол.н., профессор Зайцев В.Л.