

Садикалиева С.О., Кожаберженов Н.С., Исабек А.У., Орынбаев М.Б., Омарова З.Д., Сандыбаев Н.Т., Матраимов М.Б., Султанкулова К.Т.

**ОТ-ПЦР-РВ ЖАНА БИОЛОГИЯЛЫК ЧИП МЕТОДДУРУ
МЕНЕН КАНАТТУУЛАРДЫН ВИРУСТУК ООРУЛАРЫН САЛЫШТЫРМАЛУУ
ДИАГНОСТИКАЛОО**

Садикалиева С.О., Кожаберженов Н.С., Исабек А.У., Орынбаев М.Б., Омарова З.Д., Сандыбаев Н.Т., Матраимов М.Б., Султанкулова К.Т.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ МЕТОДАМИ
ОТ- ПЦР-РВ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА**

*S.O. Sadikalieva, N.S. Kozhabergenov, A.U. Isabek, M.B. Orynbaev, Z.D. Omarova,
N.T. Sandybaev, M.B. Matraimov, K.T. Sultankulova*

**COMPARATIVE DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES OF BIRDS BY METHODS
RT-PCR-RV AND BIOLOGICAL MICROARRAY**

УДК: 619: 578.223

Бул макалада канаттуулардын вирустук ооруларын аныктоодо ДНК-микрочиптин диагностикалык эффективдүүлүгүн жана кайтарым транскрипциядагы полимераздуу чынжыр реакциясын реалдуу режим убактысында салыштырмалуу баалоо жыйынтыгы жазылган.

Негизги сөздөр: микрочип, ОТ-ПЦР-РВ, сасык тумоо вирусу, Ньюкасл оорусунун вирусун диагностикалоо.

В работе представлены результаты сравнительной оценки диагностической эффективности ДНК-микрочипа и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) для выявления вирусных болезней птиц.

Ключевые слова: микрочип, ОТ-ПЦР-РВ, вирус гриппа, диагностика вируса болезни Ньюкасла.

The results of a comparative evaluation of the diagnostic efficiency of a DNA microarray and polymerase chain reaction with reverse transcription in real time (Realtime RT-PCR) for the detection of viral diseases of birds are presented.

Key words: microchip, realtime RT-PCR, influenza virus, Newcastle disease virus diagnostics.

Введение

В настоящее время для птицеводства Республики Казахстан потенциальную опасность представляют вирусные инфекции, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит и др. Частые вспышки инфекции в сопредельных государствах повышают риск заноса инфекции на территорию Республики Казахстан. В последнее время все больше инфекционных заболеваний протекает в ассоциации с разными микроорганизмами, что существенно влияет на клинические проявления и дифференциальную диагностику заболевания.

На сегодняшний день для диагностики вирусных болезней разрабатываются и внедряются в применение новые технологии, такие как ОТ-ПЦР-РВ и биологические микрочипы. Особенностью ОТ-ПЦР-РВ является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов ПЦР и автоматическая

регистрация и интерпретация полученных результатов. Сегодня ОТ-ПЦР-РВ успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира. Применение микрочипа для диагностики инфекционных заболеваний также имеет ряд преимуществ – прямое определение ДНК возбудителя, высокая специфичность, высокая чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, сравнительно небольшие затраты времени на проведение анализа [1-4]. Преимущества делают чип незаменимой при диагностике персистирующих вирусных инфекций, для которых характерны низкие концентрации вируса в тканях и биологических жидкостях организма в латентный период заболевания.

Целью данной работы является проведение сравнительного анализа эффективности микрочипа и ОТ-ПЦР-РВ при диагностике вирусных болезней птиц.

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве объекта исследований в работе использовали трахеальные смывы взятые от павших птиц (n=30), которые были доставлены ветеринарными специалистами из различных областей Казахстана в РГП НИИПББ. Сбор образцов проводили согласно рекомендациям ВОЗ [5].

Выделение РНК. Тотальную РНК экстрагировали из материала реагентом TRiZol (Invitrogen) и набором для выделения РНК фирмы Qiagen в соответствии с инструкциями производителя. Качество и концентрацию полученных РНК проверяли спектрофотометрически на спектрофотометре Nano Drop ND-2000.

RealTime PCR. Real Time PCR проводили по технологии «TaqMan» с использованием прибора Light Cycler 2.0, фирмы Roche. При постановке Real Time PCR использовали «OneStep RT-PCR Kit» Qiagen с использованием праймеров и зондов специфичных для вирусных болезней птиц.

ОТ-ПЦР с флуоресцентным мечением кДНК вирус. Флуоресцентное мечение кДНК вирус

осуществляют во время проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) на матрице РНК вирусов, и амплификации кДНК (ПЦР) в присутствии флуоресцентно меченых нуклеотидов, с использованием специфичных праймеров, подобранных к зондам.

Гибридизация меченой нуклеиновой кислоты с зондами на биочипе. Нарботанные флуоресцентно меченые ПЦР продукты разводили с буфером для гибридизации, который состоит из щёлочи - формамида, SCC и SDS буферов. Путем нагревания и обработки щелочью двухцепочечную кДНК разделяли на отдельные цепи (денатурированная кДНК). Денатурированную кДНК инкубировали на микрочипе в термощейкере при 37 °С и 350 об/мин в течение 2-3 ч.

Флуоресцентное сканирование. Флуоресцентное сканирование микрочипа проведено на сканере InnoScan710AL с разрешением 5 мкм, при длинах волн 532 нм и 633 нм. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Marix ver. 5.5.0. С использованием данной программы произведена детекция зондов по интенсивности флуоресцентного свечения с количественными

выходными данными. За положительный результат принимали сигнал, превышающий фоновое значение.

Результаты и обсуждение

Тридцать образцов, полученных от павших птиц были протестированы экспериментально высокочувствительными методами диагностики (ОТ-ПЦР-РВ и биологические микрочипы). Проба от одной не инфицированной птицы, которая служила негативным контролем, давала отрицательный результат при детекции вирусных болезней птиц обоими методами.

Для диагностики вирусных болезней птиц методом ОТ-ПЦР-РВ, были использованы специфические праймеры на четыре схожих птичьих возбудителя (вирус болезни Ньюкасла, вирус инфекционного бурсита, вирус инфекционного бронхита и вирус гриппа птиц). Специфичность ОТ-ПЦР-РВ имела 100%, так как отсутствовал флуоресцирующий сигнал в негативном контроле (рисунок 1).

Как видно из рисунка 1, специфический рост флуоресценции наблюдался только в пробах 8, 13, 26, содержащие кДНК вируса болезни Ньюкасла. Нарботка вирусной кДНК в процессе ОТ-ПЦР-РВ во всех пробах наблюдалась на 35 цикле реакции.

Results						
Inc	Pos	Name	Type	Call	Results	Score
☑	1		Negative	Unknown	Negative	-5,00
☑	2		Positive	Unknown	Positive	27,19
☑	3		1	Unknown	Negative	-5,00
☑	4		2	Unknown	Negative	-5,00
☑	5		3	Unknown	Negative	-5,00
☑	6		4	Unknown	Negative	-4,97
☑	7		5	Unknown	Negative	-5,00
☑	8		6	Unknown	Negative	-5,00
☑	9		7	Unknown	Negative	-5,00
☑	10		8	Unknown	Positive	>35,00
☑	11		9	Unknown	Negative	-5,00
☑	12		10	Unknown	Negative	-5,00
☑	13		11	Unknown	Negative	-5,00
☑	14		12	Unknown	Negative	-3,08
☑	15		13	Unknown	Positive	>35,00
☑	16		14	Unknown	Negative	-5,00
☑	17		15	Unknown	Negative	-5,00
☑	18		16	Unknown	Negative	-5,00
☑	19		17	Unknown	Negative	-5,00
☑	20		18	Unknown	Negative	-5,00
☑	21		19	Unknown	Negative	-5,00
☑	22		20	Unknown	Negative	-5,00
☑	23		21	Unknown	Negative	-5,00
☑	24		22	Unknown	Negative	-5,00
☑	25		23	Unknown	Negative	-5,00
☑	26		24	Unknown	Positive	>35,00
☑	27		25	Unknown	Negative	-5,00
☑	28		26	Unknown	Negative	-5,00
☑	29		27	Unknown	Negative	-5,00
☑	30		28	Unknown	Negative	-5,00
☑	31		29	Unknown	Negative	-5,00
☑	32		30	Unknown	Negative	-5,00

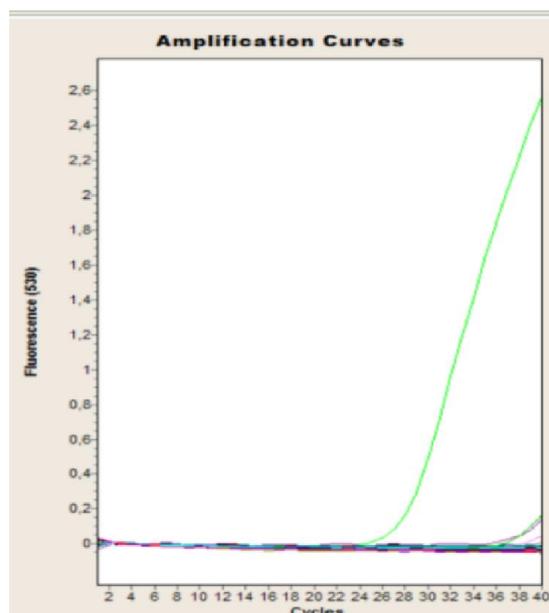


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР-РВ.

Также исследуемые образцы были проанализированы на микрочипах, предназначенных для диагностики вирусных болезней птиц (вирус болезни Ньюкасла, вирус инфекционного бурсита, вирус инфекционного бронхита и вирус гриппа птиц).

Гибридизация на микрочипе полученных флуоресцентно меченых фрагментов генов NP и M (AIV), VP2 (IBDV), S1 (IBV), NP (NDV) исследуемых вирусов приводила к образованию стабильных гибридных комплексов, обладающих высокой энергией связи, в стеклянном слайде, содержащих

олигонуклеотиды, последовательности которых были комплементарны последовательностям гибридуемых фрагментов генов NP и M для AIV, VP2 для IBDV, S1 для IBV, NP для NDV. В то же время, в ячейках, соответствующих иным вирусам, образовывались нестабильные комплексы с низкой энергией связи вследствие отсутствия комплементарности последовательностей иммобилизованных специфических олигонуклеотидов и гибридуемого исследуемого фрагмента. Таким образом, флуоресцентный

сигнал регистрировали только в тех ячейках микро-чипа, где образовывались стабильные гибрида-ционные комплексы. Для интерпретации полученных результатов приведем схему микрочипа (рисунок 2). В схеме микрочипа олигонуклеотидные зонды распо-ложены для каждого вируса. В первых двух рядах по горизонтали расположены универсальные олигонук-леотидные зонды на области NP и М генов AIV, далее расположены зонды для выявления VP2 гена IBDV и S1 гена IBV. В последнем ряду размещены зонды для выявления NP гена NDV.

Схема микрочипа представляет 16 идентичных субэреев, расположенных в виде массива, состоя-щего из 2 столбцов и 8 рядов, каждый из которых содержит олигонуклеотидные зонды, комплементар-ные антисмысловой нити генов вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита птиц и инфекционной бурсальной болезни птиц. Для скани-рования полученных результатов на ДНК-чипе ис-пользовали сканер InnoScan710AL ("Innopsys", FR) при активации канала Су5.

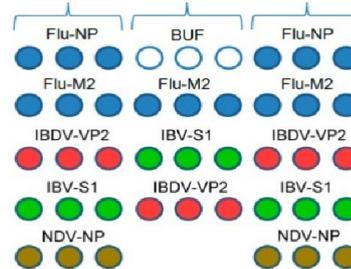


Рис. 2. Расположение олигонуклеотидных зондов на одном эррее ДНК-микрочипа для детекции вируса гриппа птиц (Flu-NP, Flu-M2), инфекционной бурсальной болезни птиц (IBDV-VP2), инфекционного бронхита птиц (IBV-S1) и болезни Ньюкасла (NDV-NP).

Интерпретация полученных результатов осу-ществлялась с использованием программного обеспе-чения Marix ver. 5.5.0. За положительный результат принимали сигнал, превышающее фоновое значение. Результат исследования считался достоверным, если на чипе при сканировании на канале Су5 визуально наблюдали ярко флуоресцирующие споты. При ис-следовании анализируемых образцов значение специ-фической флуоресценции достоверно превышало зна-чение фоновой ($P < 0,05$) (рисунок 3).

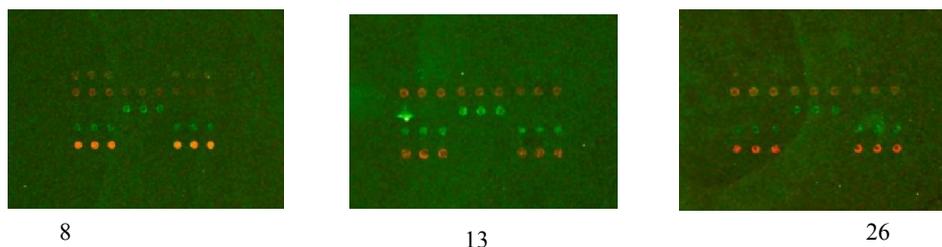


Рис. 3. Результаты сканирования меченых кДНК исследованных образцов с зондами на микрочипе.

Как видно из рисунка 3, в трех образцах из 30 ис-следованных достоверно детектированы М и NP гены вируса гриппа, NP ген болезни Ньюкасла.

В настоящее время диагностика вирусных болез-ней основаны на проведении молекулярных методов анализа [6], позволяющих выявлять только один воз-будитель в образце. Использование ОТ-ПЦР-РВ и микрочипа повышает качество и скорость анализа в молекулярной диагностике инфекционных болезней и используются в качестве самостоятельных методов при скрининговом анализе большого количества образцов проб патологического материала [7].

При проведении исследования нами был прове-ден сравнительный анализ эффективности таких диа-гностических методов как ОТ-ПЦР-РВ и ДНК-мик-рочипы. В результате проведения ПЦР анализа было обнаружено наличие кДНК вируса болезни Ньюкасла в то время как при диагностике этих же образцов методом ДНК-микрочипа было выявлено наличие двух вирусных инфекций таких как болезнь Ньюкасла и вирус гриппа.

Таким образом, диагностические результаты тести-рования ДНК-микрочипа на вирусные болезни

птиц показали наиболее высокий уровень чувстви-тельности по сравнению с данными полученными ме-тодом ОТ-ПЦР-РВ. Разработанный микрочип для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц может использоваться в массовых исследованиях в системе рутинного эпидемиологического надзора с возмож-ностью параллельного анализа одного образца на од-новременное выявление AIV, NDV, IBV и IBDV. При этом, в сравнении с современным методом ОТ-ПЦР-РВ сокращается время анализа, а предложенная схема пробоподготовки позволяет проводить анализ непо-средственно в небольших ветеринарных лаборатор-риях, избегая транспортировки термолабильной РНК.

Работа проводилась в 2015-2017 гг. в рамках проекта грантового финансирования научных иссле-дований МОН Республики Казахстан «Разработка и испытание микрочипа для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц», № 0920/ГФ 4.

Литература:

1. Kessler, N. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses / N. Kessler, O. Ferraris, K. Palmer, W. Marsh, A.

- Steel // J Clin Microbiol. - 2004. - Vol. 42, No. 5. - P. 2173-2185.
2. Lodes, M.J. Use of semiconductor-based oligonucleotide microarrays for influenza A virus subtype identification and sequencing / M.J. Lodes, D. Suci, M. Elliott, A.G. Stover, M. Ross, M. Caraballo, K. Dix, J. Crye, R.J. Webby // J. Clin. Microbiol. -2006. -Vol.44, -№.4.-P.1209-1218.
 3. Townsend, M.B. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance / M.B. Townsend, E.D. Dawson, M. Mehlmann, J.A. Smagala, D.M. Dankbar, C.L. Moore, C.B. Smith // J. Clin. Microbiol. -2006. -Vol.44, -P.2863-2871.
 4. S. Sengupta, K. Onodera, A. Lai, U.J. Melcher Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. J. Clin. Microbiol. -2003. - Vol.41, -P.4542-4550.
 5. Г.Г.Онищенко, О.И.Киселев, А.А.Соминина. Усиление надзора и контроля за гриппом как важнейший элемент подготовки к сезонным эпидемиям и очередной пандемии. Сборник методических рекомендации составлен по материалам ВОЗ. Москва, Санкт-Петербург, 2004 г. 42-48 с.
 6. Spackman E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. Methods Mol Biol. 2014; 1161:105-18. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_10.
 7. K.T. Sultankulova, O.V. Chervyakova, N.S. Kozhabergenov, K.A. Shorayeva, V. M. Strochkov, M. B. Orynbayev, N.T. Sandybayev, A.R. Sansyzybay, A.V. Vasin. Comparative Evaluation of Effectiveness of IAV chip DNA Microarray in Influenza A Diagnosis. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal Volume 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/620580>.

Рецензент: к.вет.н. Баракбаев К.
