

*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 МЕТОДДОРУ  
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

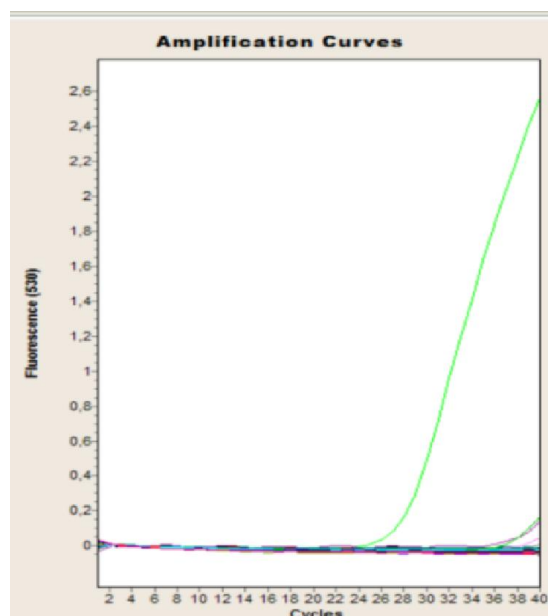


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР-РВ.

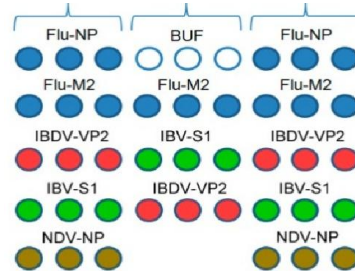
Также исследуемые образцы были проанализированы на микрочипах, предназначенных для диагностики вирусных болезней птиц (вирус болезни Ньюкасла, вирус инфекционного бурсита, вирус инфекционного бронхита и вирус гриппа птиц).

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

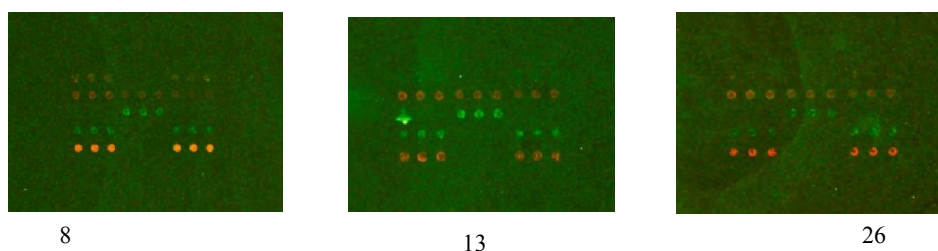
сигнал регистрировали только в тех ячейках микро-чипа, где образовывались стабильные гибрида-ционные комплексы. Для интерпретации полученных результатов приведем схему микрочипа (рисунок 2). В схеме микрочипа олигонуклеотидные зонды распо-ложены для каждого вируса. В первых двух рядах по горизонтали 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 субэ-рреев, 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 визуаль-но 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 возмоз-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-иях, 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. Stochkov, 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.**

---