УДК 619:616.98:578.82/83[PCV2,RRSS]:577.2.08:636.4

МУЛЬТИПЛЕКСНА ПЛР У ФОРМАТІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ ТА ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ

Смолянінова Є.В., Герілович А.П., Рудова Н.Г., Бузун А.І.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: antger@vet.kharkov.ua

Вовк С.І.
ТОВ «НДП» Ветеринарна медицина», м Харків, Україна

Дунаєва О.В.
Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди, м Харків, Україна

На сьогодні в Україні реєструють чимало захворювань, що є причиною репродуктивних та респіраторних розладів у свиней. Проте найбільш розповсюдженими захворюваннями, що спричиняють значний економічний збиток, є репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС) та цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС). Ці два захворювання досить розповсюджені на території Східної України і за нашими даними часто перебігають в асоціації: у 48 % досліджених зразків від загальної кількості позитивних щодо ЦВС-ІІ було виявлено генетичний матеріал збудника РРСС.

Мета нашої роботи полягала у розробці мультиплексної ПЛР у форматі реального часу з використанням системи праймерів і зондів для виявлення генетичного матеріалу вірусів РРСС та ЦВС – ІІ.

У процесі розробки мультиплексної ПЛР було підібрано оптимальний режим для ампліфікації, збалансована кількість полімерази та іонів Mg_{2+} у реакційній суміші. Розроблений протокол дозволяє одночасно виявляти обидва збудники у досліджуваній пробі, що значно скорочує енергозатрати, зменшує ризики контамінації та неспецифічних реакцій при діагностиці інфекцій, а також зекономити кошти, які витрачаються на дослідження.

Ключові слова: репродуктивно-респіраторний синдром, цирковірусна інфекція свиней, ПЛР у форматі реального часу, праймери, Taq Man зонди.

Не зважаючи на скрутні часи в Україні та недостатність фінансування у галузі сільського господарства, свинарство все одно є однією з найголовніших ланок у сільському господарстві, а продукцію свинарства вживає майже кожна родина в Україні.

Беручи до уваги те, що постійно підвищуються ціни на тваринні, генетичні ресурси, електроенергію, корми, ветеринарні препарати, засоби дезінфекції та дератизації, діагностичні дослідження, дуже важливим є удосконалення та здешевлення діагностичних методів. Основною проблемою свинарства залишаються економічні збитки, пов'язані з репродуктивними порушеннями (недоотримання приплоду, вибраковка свиноматок, кнурів і поросят) [4]. Причиною цих порушень перш за все є вірусні інфекції, хоча не останнє місце займають і неналежні умови утримання тварин і неякісні корми [1]. На сьогодні в Україні реєструють чимало захворювань, що є причиною репродуктивних і респіраторних розладів у свиней, проте найбільш розповсюдженими захворюваннями, що спричиняють значний економічний збиток, є репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС) та цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС). Ці два захворювання досить розповсюджені на території Східної України і за нашими даними часто перебігають в асоціації: у 48 % досліджених зразків від загальної кількості позитивних щодо ЦВС-ІІ було виявлено генетичний матеріал збудника РРСС [2].

Мета дослідження. Розробка мультиплексної ПЛР у форматі реального часу з використанням системи праймерів та зондів для виявлення генетичного матеріалу вірусів РРСС та ЦВС - ІІ.

Матеріали та методи. Дослідження проводилися на базі відділу молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ», який укомплектований основним переліком аналітичного та допоміжного обладнання, необхідного для здійснення молекулярно-діагностичних тестувань.

Матеріал для досліджень відбирали з числа позитивних зразків, що надійшли до ННЦ «ІЕКВМ» з господарств Харківської, Сумської та Полтавської областей, які були заморожені за температури (-70±5) °С упродовж 2013–2014 рр. Як позитивний контроль використовували живу вірус-вакцину Porcilis PRRS штам DV та ізолят вірусу ЦВС 1024, що надійшов з лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ».

Дослідження проводили в два етапи: перший етап полягав у адаптації протоколу ПЛР у форматі реального часу до праймерних систем і зондів (таблиця 1) [3] вірусів РРСС та ЦВС-ІІ.

Після ізоляція сумарної ДНК та РНК методом афінної сорбції була проведена зворотня транскрипція комерційним набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (ThermoSCIENTIFIC), за наступним протоколом: oligo (dT18)- 1 мкл, вода без нуклиаз – 5 мкл, РНК проба – 5 мкл; 65 – 5 хв.; 5 – кратний реакційний буфер – 4 мкл; Ribolock RNase inhibitor (20 моль/мл) – 1 мкл; 10 mП dNTP Mix – 2 мкл; M-MuI V Reveres Transcription (20 моль/мл) – 2 мкл 37 °С – 60 хв., 70 – 5 хв. Наступним кроком була постановка ампліфікації з використанням комерційного набору Master mix Taq ДНК – полімераза за наступним протоколом 10х Taq Buf – 2,5 мкл; DNTP – 2,5 мкл; 25 ммиль $MgCl_2$ – 2 мкл; Taq ДНК – полімераза – 1,5 мкл; праймери – 2 мкл; концентрація

зонд – 1 мкл; вода без нуклиаз – 5 мкл; проби – 8 мкл. Надалі проводилась серія ампліфікацій за різними температурами відпалу для підбору найбільш оптимальної, яка надалі підійшла б і для проведення мультиплексної ПЛР.

Таблиця 1 – Праймерні системи для індикації збудників РРСС та ЦВС II

Gen Bank #	Назва праймеру	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'3'	Довжина амплікону (п.н.)	Послідовність зонду 5'3'
M96262	E PRRSV_F	GCACCACCTCACCCAGAC (14792-14809)	76	CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC (14,819-14,842)
	E PRRSV_R	CAGTTCCTGCGCCTTGAT (14851-14868)		
AY288134	PCV-2_F	ATTACCAGCGCACTTCGG (768-785)	97	AGCAGCAACATGCCCAGCAAGAAG (812-835)
	PCV-2_ R	GGGTCCGCTTCTTCCATT (836-853)		

Другий етап полягав у з'єднані двох праймерних систем і зондів з підбором оптимальної температури і кількості полімерази та dNTP. Після проведення зворотної транскрипції була постановка ампліфікації з використанням комерційного набору Master mix Taq DNA Polymerase за наступним протоколом 10 кратним Taq буфер для полімерази – 2,5 мкл; DNTP – 2,5 мкл; 25 ммоль/мл $MgCl_2$ – 2 мкл; Taq DNA Polymerase – 1,5 мкл; праймери – 2 мкл; зонд – 1 мкл; вода без нуклиаз – 5 мкл; проби – 8 мкл.

Результати досліджень. У процесі розробки мультиплексної ПЛР необхідно було підібрати такі параметри ампліфікації, які б задовольняли вимоги всіх праймерних систем та зондів. З метою оптимізації всіх параметрів, нами була проведена серія ампліфікацій з різними градаціями температури відпалу (60, 58, 57, 55 °С) і кількістю циклів (30, 35 та 40). Встановлено, що оптимальними параметрами для проведення мультиплексної ПЛР є температура відпалу 60 °С та 40 циклів ампліфікації. Також, ураховуючи напрацювання великої кількості кінцевого продукту ампліфікації, необхідно було збалансувати кількість полімерази та іонів Mg_{2+} у реакційній суміші, що здійснювали за допомогою серії ампліфікацій з різною кількістю та концентрацією компонентів.

Реєстрацію накопичення продуктів ПЛР проводили на кожному циклі програми за допомогою системи флуоресцентної детекції (рисунок 1).

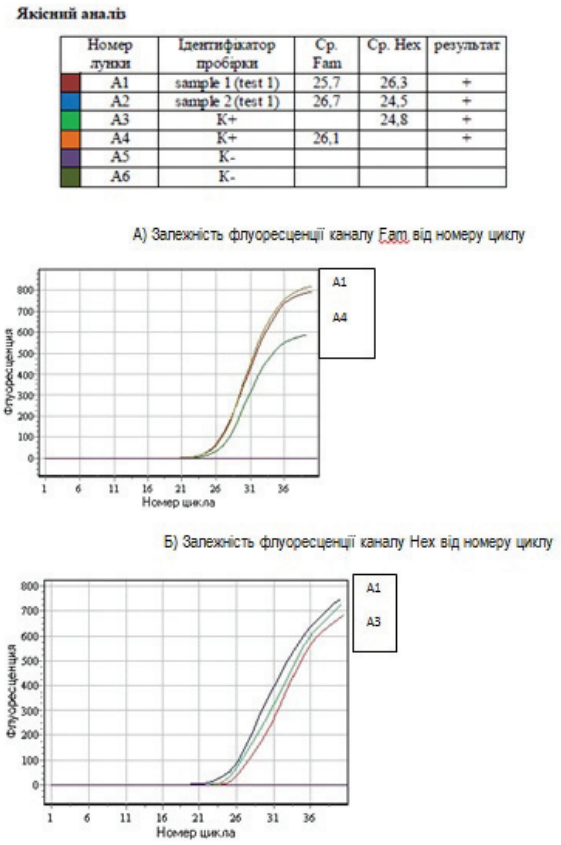

Рис. 1. Результати проведеної мультиплексної ПЛР та криві формування ПЛР продукту (Зразки А1 та А2 – містять генетичний матеріал збудників РРСС та ЦВС; Зразок А3 (+К) – містить генетичний матеріал лише збудника ЦВС; Зразок А3 (+К) – містить генетичний матеріал лише збудника РРСС)

Висновки. За результатами проведених досліджень розроблено протокол мультиплексної ПЛР у форматі реального часу з використанням системи праймерів та зондів для виявлення генетичного матеріалу вірусів РРСС та ЦВС ІІ. Розроблений протокол дозволяє одночасно виявляти обидва збудники у досліджуваній пробі, що значно скорочує енергозатрати, зменшує ризики контамінації та неспецифічних реакцій при діагностиці інфекцій, а також зекономити кошти, які витрачаються на дослідження.

Список літератури

1. A sensitive multiplex real-time PCR panel for rapid diagnosis of viruses associated with porcinerespiratory and reproductive disorders [Electronic resource] / Wu H [et al.] // Mol Cell Probes.– Available online 18 July 2014.–Mode to access : URL : http://www:sciencedirect.cjm/ sciencee/ article/ pii/ S0890850814000395.– Title from the screen.
2. Етіологічна структура цирковірусу – асоційованих свиней в господарствах східного регіону України [Текст] / А.П. Герілович [та ін.] // Вісн. аграр. науки. — 2011. — № 1. —. С. 34-36.
3. Kleiboeker S.B. Development of Real-time, multiplex PCR/RT-PCR assays for improved PRDC pathogen detection [Electronic resource] : research report / S.B. Kleiboeker; Univ. of Missouri. – June 28, 2004. – Mode to acces : URL : http://www.pork.org/ FileLibrary/ ResearchDocuments/ 03-114-KLEIBOEKER/ 6-28-04/ pdf.– Title from tht screen.
4. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic [Text] / J.E. Butler [et al.] // Immunol. Res.– 2014.– Vol. 59,№ 1-3.– P. 81-108.

MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF PORCINE REPRODUCTIVE RESPIRATORY SYNDROME AND PORCINE CIRCOVIRUS INFECTION

Smolyaninova E.V., Gerilovich A.P., Rudova N.G., Buzun A.I.
National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

Vovk S.I.
LLC «SRE «Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

Dunaeva O.V.
H.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

Today recorded a lot of diseases that caused by porcine reproductive and respiratory disorders in Ukraine, but the most common diseases, that cause significant economic damage, are porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and porcine circovirus infection (PCV). These two diseases are quite common in Eastern Ukraine and according to our data, they often occur in association: in 48 % of all positive investigated samples for PCV-II was found genetic material of the pathogen PRRS.

The aim of our work was to develop a multiplex real-time PCR using a system of primers and probes for the detection of PRRSV and PCV – II genetic material.

During the multiplex PCR development was established the best mode for amplification, was balanced amount of polymerase and Mg_{2+} ions in the reaction mixture. Was designed protocol, that allows both simultaneously detect pathogens in the research sample, significantly reduce energy consumption, the risk of contamination and non-specific reactions in the diagnosis, also saves the cost that spending on research.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine circovirus infection, real-time PCR, primers, Taq Man probes.