

УДК 619:578.53

МУЛЬТИПЛЕКС - ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВКО ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА АЧС

*Шкаликова М.В., аспирант лаборатории Молекулярной
вирусологии,
Малоголовкин А.С., кандидат биологических наук
ФГБНУ ФИЦВиМ, Вольгинский, Россия*

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), внутренний контрольный образец, ген CP204L (P30), мультиплекс - ПЦР, зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

Работа посвящена разработке и оптимизации мультиплекс - ПЦР в режиме реального времени с добавлением ВКО. Разработан внутренний контрольный образец и оптимизирован метод одно-временной амплификации ВКО и ДНК вируса АЧС. Определена аналитическая специфичность и чувствительность метода выявления генома вируса АЧС $2 \pm 0,25 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) - контагиозная вирусная болезнь, которая поражает свиней всех возрастов, вызывая геморрагическую лихорадку [1]. Она может появляться в различных формах, начиная от сверхострой, острой, подострой, хронической и бессимптомной, а летальный исход среди свиней достигает 100% [2]. Таким образом, АЧС является актуальным примером использования внутреннего контрольного образца для защиты регионов от проникновения и распространения инфекции.

В последние годы все больше диагностических методов находят свое применение в различных областях сельского хозяйства. Один из таких методов – мультиплекс - полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. ПЦР применяется для выявления полевых изолятов и лабораторных штаммов вируса АЧС и является наиболее специфичным и чувствительным методом для выявления возбудителя. Также этот метод предъявляет определенные требования к выполнению всех этапов постановки анализа, начиная с этапа взятия клинического материала и заканчивая регистрацией продуктов амплификации. Ошибка на любом из этих этапов может привести к ложному результату анализа.

Цель работы – разработка и применение универсального внутреннего контрольного образца (ВКО) для выявления ДНК вируса АЧС в формате мультиплекс.

Материал и методика исследований. В работе использованы 10% суспензии органов (селезенки, печени, лимфатических узлов, костного мозга, легкого) от 15 свиней и диких кабанов, инфицированных вирусом АЧС и 10 образцов биологического материала от клинически здоровых кабанов из разных регионов РФ (Саратовская, Воронежская, Архангельская, Московская, Рязанская, Ивановская, Новгородская, Владимирская области, Краснодарский край, КБР, республика Тыва).

ВКО – это рекомбинантная плаزمида, содержащая фрагмент гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (EGFP) длиной 70 п.о.

На первом этапе проведения работы выбраны гены CP204L и фрагмент гена, кодирующий EGFP, к которым подобраны олигонуклеотидные праймеры, указанные в работах [3] и [4].

Далее проведена оптимизация условий одновременной амплификации внутреннего контрольного образца и ДНК вируса АЧС. Затем проводили выделение и очистку ДНК вируса АЧС с добавлением ВКО с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Выявление ДНК вируса африканской чумы свиней основано на амплификации фрагмента гена CP204L (P30) вируса африканской чумы свиней совместно с ДНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), содержащего фрагмент гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (EGFP), с помощью мультиплекс - полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется методом регистрации флуоресценции, высвобождаемой при разрушении гибридационных линейных зондов технологии «Taq –man». Результат амплификации ДНК вируса африканской чумы свиней регистрируется на канале ROX/Orange, результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется на канале флуоресценции HEX/Yellow, что позволяет независимо регистрировать накопление фрагментов гена EGFP и гена CP204L (P30) вируса АЧС в ходе одной реакции. Предложенный экзогенный неконкурентный ВКО вместе с праймерами (ASFV_F1_p30;ASFV_R1_p30;EGFP_F1_R1) позволяет судить о качестве выявления/выделения ДНК вируса АЧС в одной пробирке.

ПЦР проводили в амплификаторах «Rotor - Gene 6000» (CorbettResearch, Австралия) и ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия) с флуорес-

Таблица 1 - Температурно-временной режим амплификации.

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин.	
94°C	15с	35 циклов
56°C	20с*	
72°C	15с	

Примечание:*- детекция по каналу HEX (Yellow) или ROX/Orange.

центной детекцией по каналу HEX/Yellow и ROX/Orange. При следующих режимах (Таблица 1):

При каждой постановке реакции использовали контрольные образцы: положительный контроль с водным раствором ДНК вируса АЧС, положительный контроль ВКО, положительный контроль ДНК вируса АЧС вместе с ДНК ВКО, отрицательный контроль ПЦР (с бидистиллированной водой). Образец считали положительным на наличие генома вируса африканской чумы свиней, если значение Ct по каналу Green менее 35. Образец считали отрицательным, если значение Ct по каналу Orange отсутствует для ВКО, а по каналу Yellow для АЧС. Аналитическую чувствительность определяли амплификацией последовательных десятикратных разведений плазмидной ДНК, содержащей фрагмент гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (EGFP), и культурального материала, содержащего штамм «Волгоград» вируса африканской чумы свиней (14 пассаж в культуре клеток COS-1с титром 6,0 lg ТЦД₅₀/мл.)

Результаты исследований. Проведен биоинформатический анализ и подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие участок, содержащий мишень для гибридизационного зонда, меченного флуоресцентным красителем ROX или HEX.

Используя метод мультиплекс – ПЦР в режиме реального времени с использованием экзогенного неконкурентного олигонуклеотидного внутреннего контрольного образца, проведена оптимизация условий одновременной амплификации ДНК вируса АЧС и ВКО в одной пробирке. Определена аналитическая чувствительность метода выявления генома вируса АЧС, которая составляет $2 \pm 0,25 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Данный метод также позволяет выявлять исключительно ДНК вируса АЧС и ВКО и отличать их от гетерологичных нуклеиновых кислот и загрязняющих примесей.

Заключение. Результатом данной работы является экзогенный неконкурентный внутренний контрольный образец, позволяющий контро-

лизовать качество выявления ДНК вируса АЧС в каждом образце. Это позволяет проводить наиболее эффективно лабораторные исследования для идентификации вируса АЧС в различных образцах биологического материала. Наличие ВКО дает возможность проводить своевременный мониторинг АЧС, обеспечивая экономическое благополучие, не допуская возникновения очагов болезни и повышая конкурентоспособность на рынке ветеринарных препаратов, и как следствие качество выпускаемой продукции.

Библиографический список:

1. Salas, M. L. African swine fever virus morphogenesis / M. L. Salas, G. Andrés, // *Virus Res.* – 2012.
2. Sanchez-Vizcaino, J.M. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever / J.M. Sanchez-Vizcaino, L. Mur, J.C. Gomez-Villamandos, L. Carrasco // *J. Comp. Path.* - 2015. - V. 152. – p.13.
3. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентный зонд с внутренним гасителем, комплементарные участку гена р30 (ср204l) вируса африканской чумы свиней, для использования в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: пат. 2606253 Рос. Федерация / Д.А. Кудряшов, Г.С. Бурмакина, И.А. Титов, С.Ж. Цыбанов, А.С. Малоголовкин; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии. - №20161050224; опубли. 10.01.2017.
4. Hoffmann, B. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses / B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeier, M. Beer // *J. Virol Methods.* – 2006. - Sep;136(1-2):200-9.

MULTIPLEX - PCR IN REAL TIME WITH THE VKO APPLICATION TO DETECT ASF VIRUS GENOME

Shkalikova M. V., Malogolovkin A.S.

Key words: *African swine fever (ASF), internal control sample, CP204L gene (P30), multiplex - PCR, green fluorescent protein (EGFP).*

The work is devoted to the development and optimization of multiplex - PCR in real time with the VKO addition. The internal control sample was developed and the method of simultaneous amplification of the VKO and ASF virus DNA was optimized. The analytical specificity and sensitivity of the method for detecting the ASF virus genome 2 ± 0.25 lg TCD50/cm³ has been determined.