

УДК [619:616.98:577.2]

РОЗРОБКА ДУПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ МІКОПЛАЗМ ТА ВІРУСІВ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ З ПОДАЛЬШИМ ГЕНОТИПУВАННЯМ ЗБУДНИКА

А.П. ГЕРІЛОВИЧ, І.В. ГОРАЙЧУК, В.І. БОЛОТІН, О.С. СОЛОДЯНКІН

Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини»

Україна, 61023, Харків, вул. Пушкінська, 83

e-mail: gorachuk@ukr.net

Мета. Розробити дуплексну ПЛР та оптимізувати протокол ампліфікації для одночасного виявлення генетичного матеріалу мікоплазм та вірусу діареї ВРХ з можливістю подальшої ідентифікації генотипу збудника ВД ВРХ. **Методи.** Досліджували рекомбінантні плазмідні рTZ57R/T-VD, які несуть вставку фрагмента гена E^{ns} збудників ВД ВРХ 1 генотипу (штам Ossloss) та 2 генотипу (штам Kosice), а також зразки ДНК референтних штамів *M. orale* N-I, *M. hyorhinis* BTS-7 та *M. bovis* PG45T. Було застосовано дуплексну та гніздову ПЛР. **Результати.** Під час проведення дуплексної ПЛР з оптимізованими параметрами при застосуванні праймерів P1/P2 та GPO-1/MGSO одночасно в реакції ампліфікації з позитивними контролями утворювалися амплікони довжиною 826 п.н. для збудника ВД ВРХ та 715 п.н. для мікоплазм. У результаті досліджень з оптимізованими параметрами проведення гніздової ПЛР утворювалися специфічні продукти ампліфікації довжиною 223 п.н. для збудника ВД ВРХ 1 генотипу та 488 п.н. для збудника ВД ВРХ 2 генотипу. **Висновки.** Під час проведеної роботи були розроблені та оптимізовані параметри проведення дуплексної ПЛР для одночасної індикації генетичного матеріалу представників класу *Mollicutes* та збудника ВД ВРХ з можливістю проведення гніздової ПЛР для подальшої ідентифікації генотипів вірусу діареї ВРХ.

Ключові слова: мікоплазми, ВД ВРХ, дуплексна ПЛР, гніздова ПЛР.

Вступ. З розвитком біотехнології у світі в цілому та в Україні зокрема збільшуються обсяги освоєння клітинних біотехнологій з метою діагностики вірусних та мікоплазменних інфекцій, а також розробки та виготовлення імунобіологічних препаратів. У зв'язку з цим важливе значення мають засоби контролю сировини тваринного походження, а також готової продукції щодо стерильності та виключення контамінації мікоплазмами та сторонніми вірусами [1, 2].

У спеціалізованій літературі міститься чимало відомостей про випадки мікоплазменної контамінації об'єктів біотехнологічного призначення. При цьому ізольовані види мікоплазм представлені як збудниками хвороб людей (*Mycoplasma (M.) hominis M. orale* та ін.), так і патогенами тварин (*M. hyorhinis*, *M. bovis* та ін.). Мікоплазменні ураження культур клітин зазвичай характеризуються токсичним та цитопатичним впливом, проте у ряді випадків можлива безсимптомна інфікованість [3].

© А.П. ГЕРІЛОВИЧ, І.В. ГОРАЙЧУК, В.І. БОЛОТІН, О.С. СОЛОДЯНКІН, 2013

Вірусна контамінація біопрепаратів та поживних субстанцій, зумовлена здебільшого вірусом діареї великої рогатої худоби (ВД ВРХ), є проблемою номер один у сучасній біопромисловості. Збудник представлений двома генотипами – 1-м та 2-м [4]. Віруси діареї ВРХ можуть репродукуватися без утворення видимих змін у моношарі клітин. Проте відомо, що антигени контамінантів зумовлюють неспецифічні реакції у разі застосування уражених клітин для отримання діагностичних антигенних препаратів [1, 5].

У багатьох країнах світу, у т.ч. і в Україні, для детекції бактеріальної та вірусної контамінації широкого застосування набули вірусологічні та бактеріологічні тести, проте не в усіх випадках вони є достатньо ефективними. У той же час полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є високочутливим та високоспецифічним методом, здатним виявляти генетичний матеріал інфекційного агента навіть за межами чутливості традиційних методів. З огляду на зазначене ряд міжнародних стандартів рекомендує проводити пряме виявлення нуклеїнових кислот [5, 6].

У зв'язку з цим метою нашої роботи було розробити дуплексну ПЛР та оптимізувати протокол ампліфікації для одночасного виявлення генетичного матеріалу мікоплазм та вірусу діареї ВРХ з можливістю подальшої ідентифікації генотипу збудника ВД ВРХ.

Матеріали і методи

У роботі застосовані рекомбінантні плазмиди рTZ57R/T-VD, які несуть вставку фрагмента гена *E^{ms}* збудників ВД ВРХ 1 генотипу (штам Ossloss) та 2 генотипу (штам Kosice), а також зразки ДНК референтних штамів *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 та *M. bovis* PG45T.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою методу афінної сорбції [7]. Ампліфікацію проводили за допомогою комерційного набору «GenePak PCR MasterMix Core» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Російська Федерація) та системи універсальних праймерів GPO/MGSO-1 [8] – для мікоплазм, P1/P2 [9] – для вірусу діареї ВРХ, TS3/P2 [9] – для ідентифікування збудника ВД ВРХ 1 генотипу, TS2/P2 [9] – для ідентифікування збудника ВД ВРХ 2 генотипу (табл.).

Підбір праймерів проводили за допомогою комп'ютерної програми AmplyFix 1.0 з огляду на відсутність формування димерів та шпильок під час ампліфікації.

З метою отримання чіткої візуалізації ампліконів та уникнення утворення неспецифічних продуктів реакції проводили оптимізацію протоколу ПЛР за показниками температури відпалу, концентрації праймерів та кількості ампліфікаційних циклів.

Облік результатів реакції проводили у променях УФ-світла після електрофорезу в 1% агарозному гелі за сили току 30 мА та напруги 15 В/см.

Таблиця. Праймери, які застосовувались у роботі

Назва	Послідовність праймерів (5' → 3')	Розмір ПЛР-продукту (п.н.)	Положення в геномі
GPO-1	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA	715	338–359
MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	715	1029–1055
P1	AACAAACATGGTTGGTGCAACTGGT	826	1424–1449
P2	CTTACACAGACATATTTGCCTAGGTTCCA	826	2221–2250
TS2	TGGTTAGGGAAGCAATTAGG	448	1802–1821
TS3	GGGGTCACTTGTCTGGAGG	223	2027–2045

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень для розробки дуплексної ПЛР, яка передбачає одночасне виявлення генетичного матеріалу декількох збудників, враховуючи те, що час елонгації та температура відпалу праймерів будуть однаковими, були обрані праймерні системи P1/P2 – для детекції збудників ВД ВРХ та GPO-1/MGSO – збудників класу *Mollicutes*. Відхилення температури відпалу праймерів становило ± 2 °С, а довжини отримуваних ПЛР-продуктів відрізнялися між собою на 111 п.н., що задовільно для отримання чітких результатів. Крім цього, брали до уваги результати досліджень обраних послідовностей на предмет відсутності димерів та шпильок при сумісному їх застосуванні в одній реакції.

Оптимізацію протоколу ампліфікації та температури відпалу праймерів проводили шляхом серій ампліфікацій з різними градаціями температури відпалу (50–60 °С з кроком 2 °С) та кількістю циклів (30, 35 та 40), а також з різними концентраціями праймерів (10, 15, 20 та 25 пМ).

Експериментально встановлено, що для одночасної ПЛР-детекції мікоплазм та вірусу діареї ВРХ оптимальними є температура відпалу праймерів на рівні 55 °С, 35 циклів ампліфікації в присутності 20 пМ праймерів, що доведено у кількох повторях. Отже, реакцію ампліфікації проводили за такою програмою: 1 цикл: 94 °С – 2 хв.; 35 циклів: 94 °С – 1 хв., 55 °С – 1 хв., 72 °С – 1 хв.; 1 цикл: 72 °С – 10 хв.

Під час дослідів з різними кількостями специфічних нуклеїнових кислот встановлено, що протокол проведення ПЛР має здатність до виявлення збудника в зразках, що відповідали розведенням до 100 клітин у мл, за умови 35 – циклової ампліфікації та температури відпалу 55 °С. У разі збільшення кількості циклів до 40 чутливість методики зростала, що є важливим елементом при дослідженні польового матеріалу. Використання 35 циклів у нашому

дослідженні обумовлено високою концентрацією (від 110 до 250 мкг/мл) нуклеїнових кислот, застосованих в якості матриці для ампліфікації. Специфічні фрагменти утворювались у діапазоні температур від 50 до 55 °С. Збільшення температури до 60 °С призводило до відсутності утворення продукту реакції через неможливість гібридизації вироджених праймерів. Зниження температури відпалу не приводило до збільшення чутливості тесту, проте знижувало її специфічність.

Під час досліджень з обраними параметрами проведення ПЛР встановлено, що при застосуванні праймерів P1/P2 та GPO-1/MGSO одночасно в реакції ампліфікації з позитивними контролями утворювалися амплікони очікуваної довжини: для збудника ВД ВРХ – 826 п.н. та для мікоплазм – 715 п.н. (рисунок).

На другому етапі роботи проведено аналогічний підбір параметрів ампліфікації та концентрації праймерів для подальшої ідентифікації генотипів збудника ВД ВРХ за допомогою систем праймерів TS3/P2 та TS2/P2. Експериментально встановлено, що для гніздової ПЛР оптимальна концентрація праймерів складає 20 пМ, а необхідний режим ампліфікації такий: 1 цикл: 94 °С – 2 хв.; 30 циклів: 94 °С – 1 хв., 55 °С – 1 хв., 72 °С – 1 хв.; 1 цикл: 72 °С – 10 хв.

Як видно з рисунка, в результаті досліджень з обраними параметрами проведення гніздової ПЛР утворювалися специфічні продукти ампліфікації очікуваної довжини: для збудника ВД ВРХ 1 генотипу – 223 п.н., а для збудника ВД ВРХ 2 генотипу – 488 п.н. Також було встановлено, що обрані праймери мають високу специфічність, що запобігає отриманню хибно-позитивних результатів.

Таким чином, у результаті проведеної роботи розроблено методику одночасної індикації збудників класу *Mollicutes* та ВД на першому етапі, а також визначення генотипу вірусу діареї – на другому.

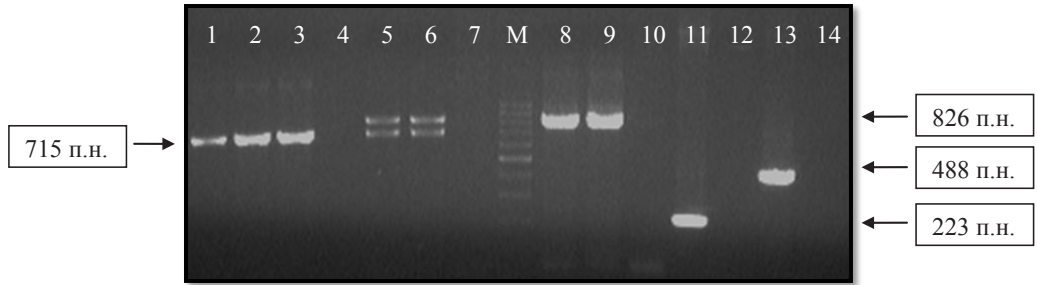


Рисунок. Електрофореграма результатів ампліфікації з системами праймерів GPO-1/MGSO, P1/P2, TS3/P2 та TS2/P2. ПЛР з праймерами GPO-1/MGSO: 1 – *M. orale* N-1; 2 – *M. hyorhinis* BTS-7; 3 – *M. bovis* PG45T; 4 – негативний контроль. Дуплекс ПЛР з праймерами GPO-1/MGSO та P1/P2: 5 – *M. bovis* PG45T та BVDV-1; 6 – *M. bovis* PG45T та BVDV-2; 7 – негативний контроль. ПЛР з праймерами P1/P2: 8 – BVDV-1; 9 – BVDV-2; 10 – негативний контроль. Гніздова ПЛР з праймерами TS3/P2: 11 – BVDV-1; 12 – BVDV-2. Гніздова ПЛР з праймерами TS2/P2: 13 – BVDV-2; 14 – BVDV-1. М – маркер молекулярної маси

У порівнянні з існуючими системами окремої детекції вірусної та бактеріальної контамінації [10–14] розроблена дуплексна ПЛР дозволяє виявляти в одній реакції декількох збудників, що дає змогу значно скоротити час і матеріальні витрати та своєчасно запобігти забрудненню об'єктів біотехнологічного призначення. До цього часу у доступній літературі описані лише окремі ПЛР методики або для визначення генотипу вірусу діареї ВРХ [15, 16], або для одночасного виявлення за допомогою дуплексної ПЛР його генетичного матеріалу разом тільки з герпесвірусами [17, 18]. Наша попередня методика проведення дуплексної ПЛР передбачала виявлення вірусу діареї ВРХ та мікоплазм, проте не дозволяла встановлювати генотип збудника ВД ВРХ [19], що має важливе значення для встановлення джерела та шляхів контамінації об'єктів біотехнологічного призначення.

Висновки

Розроблена та оптимізована методика проведення ПЛР з одночасним використанням двох систем специфічних праймерів для індикації генетичного матеріалу представників класу *Mollicutes* та збудників ВД ВРХ, при якій утворюються ПЛР-

продукти довжиною 715 та 826 п.н., відповідно. Оптимізована методика проведення гніздової ПЛР для подальшої ідентифікації генотипів вірусу діареї ВРХ.

Подяки

Автори висловлюють щире подяку професору Стефану Вільчеку (Університет ветеринарної медицини та фармації Кошице, Республіка Словачія) за надані зразки вірусу діареї ВРХ 1b (штам Ossloss) та зразки вірусу діареї ВРХ 2 (штам Kosice).

Робота виконана за підтримки Swiss National Science Foundation, Project SCOPES NF number IZ730Z0_128050: «Epidemiology of BVD in Ukraine: Development of a control program» з 2011 по 2012 рр.

Перелік літератури

1. Langdon S.P. Cell culture contamination: an overview // *Methods Mol. Med.* – 2004. – Vol. 88. – P. 309–317.
2. Lincoln C.K., Gabridge M.G. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination // *Methods Cell Biol.* – 1998. – Vol. 57. – P. 49–65.
3. Герілович А.П. Застосування методу полімеразної ланцюгової реакції в системі контролювання контамінації сторонніми вірусами і мікоплазмами культур клітин та ветеринарних імунобіологічних препаратів // *Ветеринарна біотехнологія* – 2008. – Т. 13, С. 333–339.

4. *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes // Vet. Microbiol.* – 2005. – Vol. 111. – P. 35–40.
5. *Pauwels K. Animal Cell Cultures: Risk Assessment and Biosafety Recommendations // Applied Biosafety.* – 2007. – Vol. 12, № 1. – P. 27–39.
6. *Vaccines (WHO Manual) // [Ел. ресурс] Режим доступу http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter_04/4_4_Cell_cultureproblems_identification_and_elimination.htm.*
7. *Boom R., Sol C., Salimans M. et al. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids // Journal of Clinical Microbiology.* – 1990. – Vol. 28, № 3. – P. 495–503.
8. *Van Kuppeveld F.J., van der Logt J.T., Angulo A.F. et al. Genus- and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification // Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58, № 8. – P. 2606–2615.
9. *Sullivan D.G., Akkina R.K. A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses // Virus Res.* – 1995. – Vol. 38, № 3–8. – P. 231–239.
10. *Uphoff C.C., Drexler H.G. Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction // Leukemia* – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 289–293.
11. *Sung H., Kang S.H., Bae Y.J. et al. PCR-based detection of Mycoplasma species // J. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, № 1. – P. 42–49.
12. *Kong F., James G., Gordon S. et al. Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture // Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, № 7. – P. 3195–3200.
13. *Studer E., Bertoni G., Candrian U. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines // Biologicals.* – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 289–296.
14. *Bolin S.R., Lim A., Grotelueschen D.M. et al. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from persistently infected calves born to dams vaccinated against bovine viral diarrhoea virus before breeding // Am. J. Vet. Res.* – 2009. – Vol. 70, № 1. – P. 86–91.
15. *Decaro N., Sciarretta R., Lucente M.S. et al. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle // Mol. Cell. Probes.* – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 42–46.
16. *Baxi M., McRae D., Baxi S. et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses // Vet. Microbiol.* – 2006. – Vol. 116, № 1–3. – P. 37–44.
17. *Marley M.S., Givens M.D., Galik P.K. et al. Development of a duplex quantitative polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in bovine follicular fluid // Theriogenology.* – 2008. – Vol. 70, № 2. – P. 153–160.
18. *Tramuta C., Lacerenza D., Zoppi S. et al. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples // J. Vet. Diagn. Invest.* – 2011. – Vol. 23, № 4. – P. 657–64.
19. *Болотін В.І. Розробка дуплексної ПЛР для виявлення контамінації біологічних препаратів мікоплазмами та збудником вірусної діареї ВРХ // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб.* – Харків, 2010. – Т. 94. – С. 60–61.

Представлено О.М. Бублик
Надійшла 07.05.2013

РАЗРАБОТКА ДУПЛЕКСНОЙ ПЦР
ДЛЯ ИНДИКАЦИИ МИКОПЛАЗМ И ВИРУСОВ
ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
С ПОСЛЕДУЮЩИМ ГЕНОТИПИРОВАНИЕМ
ВОЗБУДИТЕЛЯ

А.П. Герілович, І.В. Горайчук, В.І. Болотін,
А.С. Солодянкін

Национальный научный центр «Институт
экспериментальной и клинической ветеринарной
медицины»
Украина, 61023, Харьков, ул. Пушкинская, 83
e-mail: gorachuk@ukr.net

Цель. Разработать дуплексную ПЦР и оптимизировать протокол амплификации для одновременного выявления генетического материала микоплазм и вируса диареи КРС с возможностью дальнейшей идентификации генотипа возбудителя ВД КРС. **Методы.** Исследовали рекомбинантные плазмиды рTZ57R/T-VD, несущих вставку фрагмента гена E^{гнс} возбудителей ВД КРС 1 генотипа (штамм Ossloss) и 2 генотипа (штамм Kosice), а также образцы ДНК референтных штаммов *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 и *M. bovis* PG45T. Была применена дуплексная и гнездовая ПЦР. **Результаты.** В ходе проведения дуплексной ПЦР с оптимизированными параметрами при применении праймеров P1/P2 и GPO-1/MGSO одновременно в реакции амплификации с положительными контролями образовывались ампликоны длиной 826 п.н. для возбудителя ВД

КРС и 715 п.н. для мікоплазм. В результаті досліджень с оптимізованими параметрами проведення гнездової ПЦР формувались специфічні продукти ампліфікації довжини 223 п.н. для збудителя ВД КРС 1 генотипа и 488 п.н. для збудителя ВД КРС 2 генотипа. **Висновки.** В ході проведеної роботи були розроблені и оптимізовані параметри проведення дуплексної ПЦР для одночасної індикації генетичного матеріала представителів класу *Mollicutes* и збудителя ВД КРС с можливістю проведення гнездової ПЦР для подальшої ідентифікації генотипів вірусу діареї КРС.

Ключові слова: мікоплазми, ВД КРС, дуплексна ПЦР, гнездова ПЦР.

DEVELOPMENT OF DUPLEX PCR FOR DETECTION OF MYCOPLASMAS AND BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS FOLLOWED BY PATHOGEN GENOTYPING

A.P. Gerilovych, I.V. Goraichuk, V.I. Bolotin, O.S. Solodianskin

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» Ukraine, 61023, Kharkov, Pushkinskaya str., 83
e-mail: goraichuk@ukr.net

Aim. Aim is to develop duplex PCR and optimize amplification protocol for the simultaneous

detecting of mycoplasma genetic material and virus diarrhea of cattle, with the possibility of further identification of the VDC pathogen genotype. **Methods.** We studied recombinant plasmid pTZ57R/T-VD, bearing insertion of *E^{ms}* gene fragment from VDC pathogen genotype 1 (strain Ossloss) and genotype 2 (strain Kosice), as well as DNA samples of *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 and *M. bovis* PG45T reference strains. It was applied duplex and nested PCR. **Results.** In the course of the duplex PCR with optimized parameters when using primers P1/P2 and GPO-1/MGSO simultaneously in reaction amplification of positive control were formed amplicons of 826 bp for VDC and 715 bp for mycoplasma. As a result of nested PCR amplification were formed specific products of amplification of 223 bp for VDC of genotype 1 and 488 bp for VDC pathogen of genotype 2. **Conclusions.** During the ongoing work have been developed and optimized parameters of duplex PCR carrying out for the simultaneous indication of the genetic material represented by the class Mollicutes and VDC pathogen, with the possibility of nested PCR for further identification of VDC genotypes.

Key words: micoplasma, VDC, duplex PCR, nested PCR.