ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. № 3

Виявлення вірусу класичної чуми свиней за допомогою обернено-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції та молекулярної гібридизації

С. Д. Кириленко, О. М. Дерябін[1], О. Г. Дерябіна[1], О. Л. Кириленко, Ю. О. Чередник, Л. П. Гришок[1], О. Т. Шиков[1]

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
[1]Інститут ветеринарної медицини УААН
252151, Київ, вул. Донецька, 30

Для виявлення методом обернено-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції геномної РНК вірусу класичної чуми свиней (КЧС) у патматеріалах, отриманих від тварин з різним клінічним проявом та перебігом захворювання КЧС, було використано олігонуклеотидні затравки, що фланкують фрагмент (846 п. н.) гена структурного білка гп51—55 цього вірусу. Обговорюються можливості використання розроблених праймерів для диференціації високо- та низьковірулентних ізолятів вірусу КЧС та в проведенні молекулярно-епізоотичних досліджень.

Вступ. Сучасна діагностика пестивірусів (ПВ), збудників небезпечних хвороб овець, свиней та великої рогатої худоби (ВРХ), що призводять до великих економічних збитків у тваринництві в усіх країнах світу, грунтується на використанні серологічних методів. Референтним, згідно з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро, визнано метод флюоресцентних антитіл (МФА) в кріозрізах, відбитках та з виділенням вірусу в культурі клітин (КК). Поступово, як не менш чутливі і дешевші, набувають розповсюдження імуноферментний тест в КК та імуноферментний аналіз (ІФА) [1, 2]. Принципове значення має використання у цих реакціях моноклональних антитіл (МКА) для підвищення їх специфічності у зв'язку з наявністю перехресних взаємодій та випадками виділення від свиней вірусу вірусної діареї ВРХ [3].

Проблеми моніторингу циркуляції збудника серед свійських та диких тварин, прояви інфекції в атиповій формі, привнесення в дику популяцію ПВ вірусу у складі живих вакцин вимагають використання методів, спрямованих на аналіз геному вірусу та здатних диференціювати високо- і низьковірулентні, вакцинні та дикі ізоляти і штами, вивчати характер тенденцій еволюційного процесу. Визначення та аналіз первинної послідовності геномної РНК, рекомбінантне відтворення структурних білків віріону, отримання МКА і вивчення за їх допомогою антигенної мінливості у штамів та ізолятів вірусу класичної чуми свиней (ВКЧС) різного походження є основними напрямками вирішення проблеми боротьби з цим небезпечним захворюванням.

Метою наших досліджень було виявлення ВКЧС у патматеріалах та інфікованих культурах клітин за допомогою обернено-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ОТ-ПЛР) з перевіркою специфічності отриманих фрагментів методом молекулярної гібридизації з відповідним фрагментом геному контрольного штама ВКЧС Ші-Минь.

Матеріали та методи. *Штами та культури.* В

© С. Д. КИРИЛЕНКО, О. М. ДЕРЯБІН, О. Г. ДЕРЯБІНА, О. Л. КИРИЛЕНКО, Ю. О. ЧЕРЕДНИК, Л. П. ГРИШОК, О. Т. ШИКОВ, 1997

роботі використано контрольний (вірулентний) штам ВКЧС Ші-Минь, репродукований в перевивній культурі клітин нирки свині РК-15; патматеріали у вигляді 20 %-ї суспензії органів від загиблих або вимушено забитих свиней із різних областей і господарств України з різним клінічним проявом і перебігом захворювання; отримана нами раніше [4] рекомбінантна плазміда *pUC18*-776, що несе фрагмент гена структурного білка *E1* ВКЧС.

Метод флюоресцентних антитіл. Для лабораторної діагностики КЧС і проведення експертизи патматеріалів на наявність ВКЧС застосовували прямий варіант методу імунофлюоресценції. Для виявлення антигена ВКЧС на покривних скельцях готували мазки-відбитки із органів і тканин: селезінки, нирок, лімфатичних вузлів, мигдаликів, легенів, червоного кісткового мозку. Після фіксації в холодному ацетоні мазки-відбитки інкубували з кон'югатом ФІТЦ — імуноглобулін КЧС з «Набору препаратів для імунофлюоресцентної діагностики КЧС» (ТУ 4620-1-84), виготовленого ВНДіВВ (м. Покров, Росія). Для виділення вірусу використовували культуру клітин РК-15, вирощену на покривних скельцях в поживному середовищі Ігла (МЕМ) з додаванням 10 % ембріональної сироватки ВРХ. Мікроскопію проводили у відображеному синьому світлі на люмінесцентному мікроскопі ЛЮМАМ із збуджуючими фільтрами ФС-1-2, СС-15-2, БС-8-2 і замикаючим N1 або N2/Ж-18.

Виділення віріонної РНК, ОТ-ПЛР та рестрикційний аналіз здійснювали, як у роботі [4]. Для ОТ-ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, підібрані і синтезовані нами раніше [4]. Прямий праймер (Chum-A) має послідовність 5′-TTACCCACTTCCGTGACATTCG-3′, обернений (Chum-B) — 5′-TATCTTCCTCCCAACAGTGCC-3′.

Молекулярна гібридизація. Після електрофорезу в ТБЕХ0.5, фарбування бромистим етидієм та фотографування фрагменти ДНК переносили та імобілізували на нітроцелюлозній мембрані Hybond-C Extra фірми «Amersham» (Велика Британія) за методикою [5] у відповідності з методичними рекомендаціями цієї ж фірми. Мічення диджоксидезоксиуридином (DIG) фрагментів ДНК, виділених з агарозного геля за методом [6], молекулярну гібридизацію та обробку результатів гібридизації виконували за допомогою DIG DNA Labelling and Detection Kit фірми «Boehringer Mannheim» (ФРГ) в жорстких умовах у відповідності з рекомендаціями виробника.

Результати та обговорення. Нами підібрано та синтезовано оригінальну пару олігонуклеотидних праймерів Chum-A та Chum-B, за допомогою яких можливо ампліфікувати фрагмент гена *E1* ВКЧС довжиною 846 п. н. Перелік та характеристики інфекційних матеріалів, використаних у дослідженні, наведено в таблиці.

Для виділення та очищення віріонної РНК було використано простий метод [7] лізису за допомогою DS-Na та протеїнази К з наступною фенольною екстракцією. В результаті одержано препарати сумарної фракції нуклеїнових кислот, придатні для використання в ОТ-ПЛР навіть після продовженого зберігання під етиловим спиртом протягом 6 місяців при −20 °С або 2 діб при кімнатній температурі (даних не наведено). Присутність геномної ДНК свині або хромосомної ДНК культур клітин не призводила до хибного відтворення ОТ-ПЛР з праймерами Chum-A та Chum-B в контрольних експериментах (даних не наведено).

На стадії оберненої транскрипції для побудови кДНК в реакційну суміш вносили обидва праймери, хоча для затравлювання РНК-залежного синтезу першого ланцюга кДНК на позитивному ланцюгу РНК необхідний тільки обернений праймер. Відомо, що присутність прямого праймера стабілізує вихід кДНК. Окрім того, додавання обох праймерів доречно з точки зору мінімізації потенційних похибок піпетування.

На мал. 1 наведено типову картину електрофоретичного розподілення фрагментів ОТ-ПЛР з праймерами Chum-A та Chum-B та препаратами нуклеїнових кислот. На доріжці *3* спостерігається смужка, що відповідає за своїм розміром фрагменту, близькому за величиною до 846 п. н. Цей матеріал (експертиза 67, таблиця) був взятий від загиблої дорослої вакцинованої тварини. Клінічна та патоморфологічна картина протікання була сильно вираженою та нагадувала таку африканської чуми свиней.

На доріжках *2*, *4*, *5* (див. мал. 1) фрагментів ДНК очікуваного розміру не спостерігалося. Ці матеріали дали негативні результати виявлення. Цікаво, що на доріжку *2* з негативним результатом було нанесено продукт ампліфікації препарату, виділеного з суспензії лімфовузла, взятого від загиблої 7-місячної тварини, препарат селезінки якої виявився позитивним у цій же системі (мал. 2, *а*). Подібні результати було відмічено в роботі [8]. Не виключено також, що зразок лімфовузла було направлено з порушенням вимог відбору патматеріалів для експертизи. Хоча можливі такі варіанти вірусу, при яких праймери можуть бути недостатньо комплементарні геномній РНК вірусу, що може призвести до хибнонегативних результатів, але у випадку експертизи 95 (лімфовузол) негативний результат було підтверджено і в МФА.

Перелік зразків інфекційних матеріалів, використаних в роботі. Подано короткі характеристики та результати тестувань різними методами

№ експертизи	Вікова група та стан	Наявність ознак		Використана вакцина	Вид матеріалу	Результат тестування в МФА		Результат виявлення в	
		Клінічні	Патоморфологічні			Відбиток	У культурі клітин	ОТ-ПЛР	гібридизації
41	—	—	—	—	Штам Ші-Минь, 41-й пасаж у КК РК-15	+	НВ	+	+
—	—	—	—	—	Вакцина «ЛК», м. Покров	НВ	НВ	+/=	–
67	Від загиблих свиней	+	+	«ЛК», м. Покров	Суспензія селезінки (20 %)	+/–	НВ	+	+
89	Від вимушено забитих	СВ	СВ	ВГНКИ Сумської біофабрики	Те саме	+	–	–	НВ
95	Від загиблих 7-місячних поросят	+	+	Те саме	Суспензія (20 %)				
					селезінки	+	–	+	+
					лімфатичних вузлів	–	–	–	НВ
					лізату інфікованої КК	–	НВ	–	НВ
96	Від 2-місячного поросяти	СВ	+	«ЛК-К»	Суспензія (20 %)				
					селезінки	+	–	–	НВ
					легенів	–	–	–	НВ
					лізату інфікованої КК	–	НВ	–	НВ
98	Те саме	+	+	«ЛК-К» РАН, с. № 18	КК РК-15, інфікована суспензією легенів	+	–	–	–
103	«	НД	НД	Не вакциновані	Суспензія селезінки (20 %)	+	–	+/=	–
104	Від вимушено забитих	СВ	+	Вакциновані	Те саме	+	–	+/=	–
107	Від безмолозивних поросят	СВ	+	«ЛК», м. Покров	Суспензія селезінки (20 %), порося №				
					1	+	–	+/=	–
					2	+	–	+/=	–
					3	+/–	–	–	–

р и м і т к а. «+» — позитивний результат; «-» — негативний результат; «+/-» — неявно виражений результат; «+/=» — зподілення смужок на гель-електрофорезі, що відрізнялося від позитивного контролю та повторювалося на деяких зразках; СВ — абковиражені ознаки; НВ — не визначали; НД — немає даних.

При виявленні ВКЧС методом ОТ-ПЛР було мічено, що в деяких зразках спостерігається типове розподілення фрагментів на електрофограмах (див. мал. 2, *а*). Так, наприклад, на ріжці *3* (експертиза 104) відмічено три смужки ної інтенсивності, які не відповідали за своїми змірами характеристичному фрагментові 846 п. (приблизно 650, 400 та 300 п. н.) і в той же час являли собою типової картини негативного ре-ьтату (відсутність будь-яких смужок на фоні кого шлейфу). Такі результати в таблиці позна-ю як «+/=». Ампліфікація матеріалу, виділеного зразка вакцинного препарату ЛК, обумовлювала логічне розподілення смужок (доріжки *4*, *6*).

Електрофоретичні фрагменти з геля, поданого на мал. 2, *а*, переносили на нітроцелюлозну мембрану та гібридизували з фрагментом величиною 776 п. н. гена *E1* штама Ші-Минь вірусу КЧС (*SacI-EcoRI*-фрагмент плазміди *pUC18*-776), міченим DIG. Результати гібридизації наведено на мал. 2, *б*. Видно, що всі три коротші фрагменти (650, 400 та 300 п. н.) не гібридизуються з фрагментом гена *E1* ВКЧС у жорстких умовах на відміну від характеристичного фрагмента розміром 846 п. н., який добре гібридизується (доріжка *2*, експертиза 95). Можна дійти висновку, що нехарактерні фрагменти не мають вираженої гомології з фрагментом гена *гп51-55* ВКЧС.

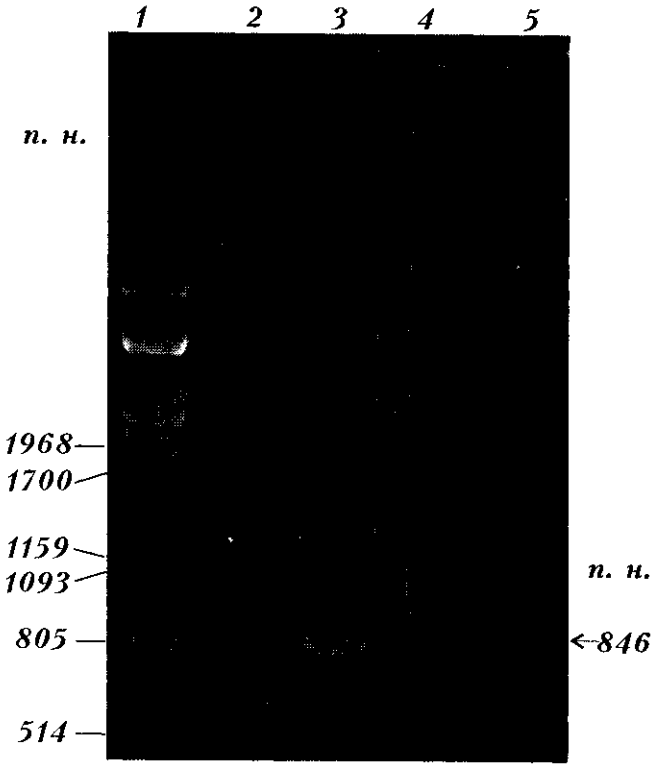

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ОТ-ПЛР з праймерами Chum-A та Chum-B та препаратами нуклеїнових кислот: *1* — маркер величини фрагментів ДНК (гідроліз ДНК фага *λ* рестриктазою *PstI* (розміри фрагментів вказані ліворуч); *2—5* — продукти ОТ-ПЛР з препаратами нуклеїнових кислот із зразків патматеріалів (*2* — експертиза 95, суспензія лімфовузла; *3* — експертиза 67, суспензія селезінки; *4* — експертиза 89, суспензія селезінки; *5* — експертиза 96, суспензія селезінки). Електрофорез було проведено в 1 %-й агарозі та в буфері 0,5 × TBE

вірулентного штама Ші-Минь ВКЧС довжиною 846 п. н. [4]. Дослідження патматеріалів методом ОТ-ПЛР показали, що у випадках гострої форми КЧС (експертизи 67, 95) розміри продуктів ампліфікації не відрізнялися від фрагмента контрольного штама Ші-Минь, експертиза 41 (даних не наведено). При

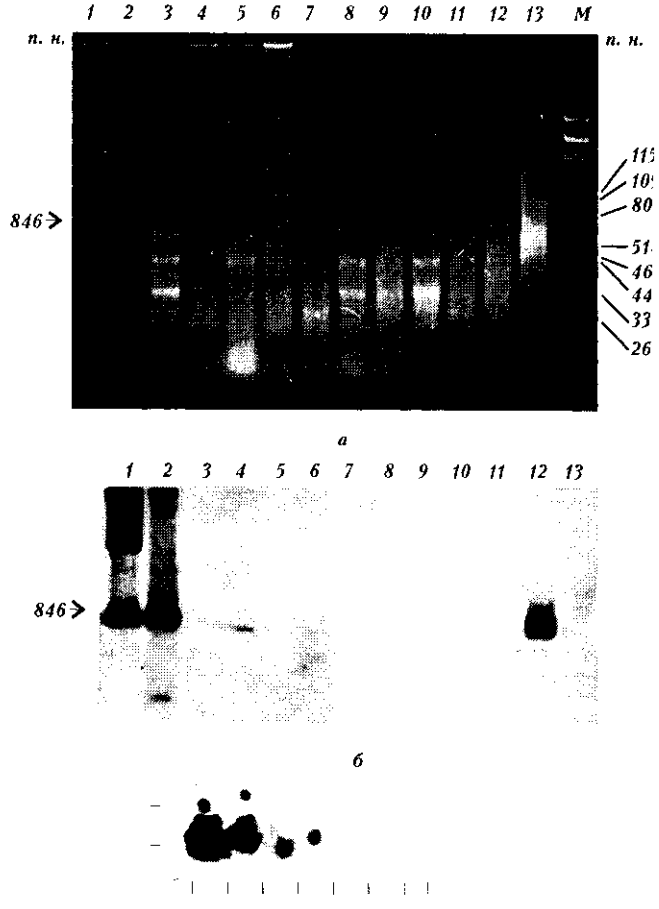

Рис. 2. Електрофореграма в 1 %-й агарозі та буфері 0,5 × T рестриктних фрагментів рекомбінантних плазмід та продук ОТ-ПЛР (*а*) та гібридизація по Саузерну з матеріалом, пере сеним з геля А, та DIG-міченим фрагментом (776 п. плазміди *pUC18*-776, гідролізованої *SacI* та *EcoRI* (*б*): *1* фрагменти гідролізу ендонуклеазами рестрикції *SacI* та *Ecc* рекомбінантної плазміди *pUC18*-776; *2—13* — продукти О ПЛР з праймерами Chum-A та Chum-B та препаратами н леїнових кислот (*2* — експертиза 95; *3, 10* — експертиза 104 *6* — вакцинний препарат ЛК; *5* — патматеріал від тварини експертизи 107; *7, 8, 9* — патматеріали експертизи 107 тварин 3, 2, 1 відповідно; *11* — експертиза 103; *12* — 4 пасаж ВКЧС штама Ші-Минь на культурі клітин РК-15; *13* експертиза 98); М — маркер величини фрагментів ДНК (роліз ДНК фага *λ* рестриктазою *PstI* (розміри фрагме вказано праворуч); *в* — контрольні дот-нанесення для контро специфічності та чутливості методів гібридизації та детек Пояснення в тексті

На мал. 2 приведені дот-нанесення для контролю специфічності та чутливості методів гібридизації і детекції. У верхньому рядку нанесено розбавлення контрольного міченого зонда (контроль детекції), у нижньому — п'ятикратні розбавлення контрольної мішені (*pUC18*-776), починаючи з 1 нг. Видно, що чутливість методу була на рівні одиниць пікограмів. Цього достатньо для виявлення незначної гомології.

Синтезована пара олігонуклеотидних затравок була спроектована по послідовності РНК вірулентного штама Brescia та використана для клонування фрагмента гена *гп*51-55 контрольного

цьому результати виявлення ВКЧС методом ОТ-ПЛР збігалися з такими референтного методу (МФА); ампліфіковані фрагменти добре гібридизувалися з *EcoRI-SacI*-фрагментом плазміди *pUC18*-776 (див. рис. 2, *б*).

Результати виявлення ВКЧС методом ОТ-ПЛР при дослідженні патматеріалів з нечітко вираженим протіканням хвороби (експертизи 89, 96, 98) були негативними та не збігалися з результатами виявлення референтним методом (у відбитках). На наш погляд, подібні розбіжності можуть бути викликані кількома причинами: використана пара праймерів була відпрацьована на високовірулентні форми ВКЧС і, можливо, не здатна ампліфікувати атипові форми вірусу; переживанням вакцинних форм вірусу (повторний аналіз в МФА з виділенням в КК був негативним) [9]; персистенцією гетерологічного пестивірусу (вірусу діареї ВРХ) [10].

Особливу увагу привертають результати виявлення ВКЧС за матеріалами експертиз 103, 104, 107. Позитивні в МФА ці зразки дали нетипову картину розподілення в ОТ-ПЛР (див. мал. 2, *а*). Замість фрагмента розміром 846 п. н. спостерігалися три нехарактеристичні фрагменти розміром близько 650, 400 та 300 п. н., які не гібридизувалися з фрагментом гена *gp51-55* ВКЧС (див. мал. 2, *б*). Цікаво, що аналогічні фрагменти були отримані при відтворенні ОТ-ПЛР з РНК, виділеною із зразка вакцинного препарату «ЛК»; вони також не виявляли гомології з фрагментом штама Ші-Минь при гібридизації.

Ці результати потребують додаткових досліджень, пов'язаних з визначенням первинної нуклеотидної послідовності отриманих фрагментів, аналізу різних вакцинних препаратів та, можливо, окремих серій вакцин. Крім того, на наш погляд, для аналізу результатів, що припускають неоднозначне тлумачення, необхідним є використання додаткової пари праймерів на висококонсервативні ділянки геному, загальних для усіх пестивірусів, що виконували б роль позитивного контролю на пестивіруси [11, 12].

При проведенні досліджень різних пестивірусів методом ОТ-ПЛР перспективною є можливість вивчення рестрикційного поліморфізму вірусного геному [13, 14]. Так, нами було виявлено [4], що у високовірулентного польового ізоляту ВКЧС (експертиза 95) стосовно референтного штама Bresciа та контрольного штама Ші-Минь спостерігається втрата сайту пізнавання ендонуклеази рестрикції *EcoRI* (даних не наведено). Рестрикційний аналіз є досить інформативним та значно дешевшим, ніж визначення нуклеотидної послідовності, і може бути використаний для початкових етапів молекулярно-епізоотичного дослідження пестивірусів в Україні.

С. Д. Кириленко, О. М. Дерябин, О. Г. Дерябина, О. Л. Кириленко, Ю. О. Чередник, Л. П. Гришок, А. Т. Шиков

Выявление вируса классической чумы свиней с помощью обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции и молекулярной гибридизации

Резюме

Для выявления методом обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции геномной РНК вируса классической чумы свиней (КЧС) в патматериалах, полученных от животных с различными клиническими проявлениями и протеканием заболевания КЧС, использованы олигонуклеотидные затравки, фланкирующие фрагмент (846 п. о.) гена структурного белка gp51-55 этого вируса. Обсуждаются возможности использования разработанных праймеров для дифференциации высоко- и низковирулентных изолятов вируса КЧС и в проведении молекулярно-эпизоотических исследований.

Sergij D. Kirilenko, Oleg M. Deriabin, Olena G. Deriabina, Olga L. Kirilenko, Jurij O. Cherednik, Ljudmila P. Grishok, Oleksandr T. Shikov

Detection of classical swine fever virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular hybridization

Summary

Oligonucleotide primers flanking 846 bp fragment of gp51-55 structural gene of classical swine fever virus (CSFV) have been used in polymerase chain reaction for detection of genomic RNA of CSFV in pathological specimens taken from animals with different clinical signs and disease running. The possibility of their use in the differentiation of high- and low virulent CSFV isolates and in molecular epidemiological investigations is discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Horner G. W., Tham Kok-Mun., Orr D. et al.* Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections // Vet. Microbiol.—1995.—**43**.—P. 75—84.
2. *Moser C., Ruggli N., Tratschin J. D., Hofmann M. A.* Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein *E2* // Immunobiology of viral infections: 3rd Congr. Eur. Soc. Vet. Virol.—Interlaken, 1995.—P. 327—330.
3. *Paton D. J., Sands J. J., Lowings J. P. et al.* A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing // Vet. Res.—1995.—**26**.—P. 92—103.
4. *Кириленко С. Д., Дерябін О. М., Кириленко О. Л. та ін.* Клонування та надекспресія фрагмента гена структурного білка *E1* штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней // Біополімери та клітина.—1996.—**12**, № 5.—С. 93—99.
5. *Southern E. M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—1975.—**98**.—P. 503—517.
6. *Hojman F.* A novel electrophoretic strategy allows detection of very low amounts of circular retroviral DNA by PCR // Meth. Mol. and Cell. Biology.—1990.—**2**.—P. 66—69.

7. *Rasschaert D.* Etude d'un coronavirus, le virus de la gastro-enterite transmissible du porc: identification des genes structuraux et non-structuraux et localization d'un site antigenique majeur sur la sequence de la glycoproteine de spicule *E2* // These de docteur en sciences.—Paris: Universite de Paris-Sud., 1988.—P.18.
8. *Shih-Tung L., Shui-Nin L., Ding-Cheng W. et al.* Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction // J. Virol. Methods.—1991.—**35**.—P. 227—236.
9. *Семешкин А. Л., Вишняков И. Ф.* Состояние и перспективы мер борьбы с классической чумой свиней // Материалы. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ.—Покров, 1995.—С. 29—35.
10. *Afshar A., Dulac G. C., Bouffard A.* Application of peroxidase labelled antibodies to hog cholera and bovine viral diarhea viruses // J. Virol. Methods.—1989.—**23**.—P. 253—262.
11. *Katz J. B., Ridpath J. F., Bolin S. R.* Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA Nested-amplification approach // J. Clin. Microbiol.—1993.—**31**, N 3.—P. 565—568.
12. *Sullivan D. G., Akkina R. K.* A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses // Vir. Res.—1995.—**38**.—P. 231—239.
13. *Vilcek S., Herring A. J., Herring J. A. et al.* Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis // Arch. Virol.—1994.—**136**.—P. 309—323.
14. *Harding M., Lutze-Wallace L., Prud'homme I. et al.* Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus // J. Clin. Microbiol.—1994.—**32**, N 10.—P. 2600—2602.

УДК 619:616:575.11-072.2
Надійшла до редакції 09.12.96