



УДК 619:57.083.18:578.835.2

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

*К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов, К.Х. Жуматов, С.Е. Асанова,  
Н.Г. Ишмухаметова, А.Е. Абдикаримова, М.Х. Саятов*

ecovir@nursat.kz

ДГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

В статье представлены результаты разработки и испытания мультиплексной ПЦР тест-системы для дифференциальной диагностики орто- и парамиксовирусных инфекций птиц.

**Введение**

Грипп и болезнь Ньюкасла являются наиболее контагиозными и опасными вирусными инфекциями домашних и диких птиц. Их возбудители, относящиеся к семействам орто- и парамиксовирусов, вызывают массовые падежи и наносят значительный урон экономике сельского хозяйства (1, 2).

Существует возможность появления смешанных инфекций, вызванных различными возбудителями после применения поливалентных живых вакцин и тесного скученного содержания птиц, а также при заносе инфекционных агентов извне (3, 4).

Необходимость дифференциальной диагностики орто- и парамиксовирусных инфекций объясняется тем, что вызываемые ими клиническая картина и патологоанатомические изменения очень сходны. В настоящее время в Казахстане с этой целью используются иммунологические методы – реакции торможения гемагглютинации и диффузионной преципитации после выделения возбудителей в развивающихся куриных эмбрионах и культурах клеток, что требует больших затрат времени и средств (5). Кроме того, ввиду штаммовой специфичности антигенов существенно снижается ценность реакции торможения гемагглютинации при идентификации различных подтипов вируса гриппа, выделенных во время вспышки.

Нередко для дифференциации орто- и парамиксовирусов в практических условиях

используют раствор азотнокислого натрия в ацетатном буферном растворе. При установлении полной потери вирусом гемагглютинирующей активности, возбудитель диагностируют как ортомиксовирус, а при сохранении исходной активности или незначительном ее снижении (в 2-4 раза) – парамиксовирус птиц. Этот метод обладает низкой чувствительностью и пригоден только для работы с вирусами в высоких концентрациях (6).

Имеются также доступные коммерческие тест-системы для диагностики этих двух вирусных инфекций в реакции иммунофлуоресценции и в различных модификациях иммуноферментного анализа (твердофазный ИФА и иммунохроматография), но эти методы менее чувствительны и специфичны, по сравнению с выделением возбудителя с помощью развивающихся куриных эмбрионов.

В последние годы для обнаружения и идентификации вирусов гриппа и болезни Ньюкасла большое распространение получил метод ПЦР, основанный на амплификации ДНК-копий специфического участка РНК вирусов и выявлении конечного продукта с помощью электрофореза в агарозном геле. Преимущество метода заключается в оперативности и точности, что делает его эффективным для крупномасштабного мониторинга вируса гриппа А, болезни Ньюкасла и эпизоотического контроля в целом (7). Несмотря на указанные преимущества, с помощью обычной



ПЦР можно обнаружить только один инфекционный агент, в то время как мультиплекс ПЦР позволяет выявить несколько возбудителей в одной реакции, что значительно снижает стоимость диагностических процедур при сочетании высокой чувствительности и скорости анализа.

В связи с этим нами разработана мультиплексная ПЦР тест-система для дифференциальной диагностики орто- и парамиксовирусных инфекций в целях оптимизации контроля над распространением возбудителей этих опасных вирусных инфекций в Казахстане.

В статье описываются этапы ее создания и результаты испытания в лабораторных условиях.

### Материалы и методы

Сбор полевых материалов, изоляция вирусов, восстановительные пассажы и получение биомассы вирусов выполнялись по методикам, рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения и Международным эпизоотическим бюро (5, 8).

В работе использовали казахстанские изоляты вируса гриппа: А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6), А/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6), А/чирок-трескунок/Коргалжын/1797/06, А/чирок-трескунок/Коргалжын/1797/06, А/чирок-трескунок/ЮКО/8048/08 (H3N8), А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8), А/хохлатая чернеть/Актау/1456/06 (H4N6), А/лебедь шипун/Актау/1460/06 (H5N1), А/индюк/Алматы/535/04 (H11N9), А/серебристая чайка/Атырау/280/02 (H13N6), А/черноголовый хохотун/Атырау/2966/08 (H13N6), А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3), а также болезни Ньюкасла: ПМВ-1/курица/Алматы/55/00, ПМВ-1/голубь/Алматы/1064/05, ПМВ-1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06, ПМВ-1/цыпленок/Караганда/1652/06.

Клонирование вирусов проводили методом предельных разведений на 9-10-дневных развивающихся куриных эмбрионах.

Очистку и концентрацию вирусов осуществляли в градиенте плотности сахарозы (30-60%) на центрифуге «Beckman» при 37000 об/мин, 90 мин. Вирус собирали на границе раздела и ресуспендировали в минимальном объеме Трис-НСl буфера.

Выделение РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Комплементарные ДНК из РНК получали методом обратной транскрипции при помощи универсального праймера uni-12 для вирусов гриппа А и случайных гексамерных праймеров (random hexamers) для вируса болезни Ньюкасла из набора First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) согласно наставлениям производителя.

Секвенирование ДНК проводили в Национальной лаборатории биотехнологии коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК с использованием терминирующих ди-деоксинуклеотидов на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов евразийских линий проводили с помощью компьютерной программы BioEdit.

Специфические праймеры к различным фрагментам консервативной последовательности генов вирусов конструировали с помощью компьютерной программы Primer Premier 5. Их тестирование выполняли при одинаковых концентрациях и условиях термоциклирования в мультиплекс - ПЦР. Подбор оптимального режима для постановки мультиплекс - ПЦР проводили варьированием параметров температуры и времени. Реакцию ставили в термоциклере Eppendorf Gradient (Германия).

Электрофорез проводили в 2% растворе агарозы (Sigma, США) в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Biostep (Великобритания).



## Результаты и обсуждение

Для разработки тест-системы РНК выделяли из очищенных и концентрированных вирусных препаратов в объеме 50 мкл.

Комплементарные ДНК из РНК вирусов получали методом обратной транскрипции. Окончательный объем каждой кДНК составлял 40 мкл, а их концентрация равнялась 220-891 нг/мкл.

В результате секвенирования определены нуклеотидные последовательности NP, М и NS генов 12 казахстанских изолятов вируса гриппа А с различными подтипами НА, а также F и М генов 4 изолятов вируса болезни Ньюкасла. Далее проведено их выравнивание с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов евразийских линий с построением консенсусных последовательностей (рисунок 1).

На основе консенсусных последовательностей (рисунок 1), подобраны специфические праймеры. Синтез праймеров осуществлен в компании Sigma-Genosys.

**А**  
ATGGACTCATCNAGGACANATNNGGCTGTACTTTGATTCTGCCCTNCCCTTCNAG  
CANCTGTTAGCATTTCCGATNGTCNTACAGACAGGAGANGGGAAGAACG  
AAATCNCNCNCAATANAGGATCCAGCGNCTTGANTCGTGGACAGACAGNAAG  
GANGACTCGGTATTATCATCACACCTANGGNTTCTATCTTTGANGTTGGGAATGAA  
GAAGCCACTGTCGNNNTGATCAATGANAANCCANGCNCAGNACTNTNCCN  
NGCNATGCTCTGCNTAGGNAGNGTCCNNAANGNNGGAGATCTTGTGAGCTGG  
CNAGNGCCTGNTCTACTATGGTGGTAACNTGCAAGAGAGTGCAACTAANACT  
GAGAGAAATNGTCTTCTCAGTAGTGCAGGACCCNCGTGTCTGCAAGCTGTAN  
GGTTGTGGCAANANNTACTCNTCAGTGAATGCAGTNAAGCANGTGAANGCNC  
CAGANAAGATNCCNNGGAGCGGAACCTAGANTANAAGGTGAANTTTGTCTCN  
TTGACNGTGGTNCNGGANNAGGATGTCTACANGATCCCACTGCAGNATTGAA  
NGTNTCTGGCTCNAGNCTGTACAATCTTGCCTCAATGTCACTATTGATGTGGA  
GGTNGANCCGAAGAGCCCGTTNGTNAATCNCTTTCTAAGTCNAGACGCGAT  
ACTATGCTAATCTCTTNTTGCATATCGGGCTTATGTCCACTGTAGATAAGAGGG  
NAAGAAAGTGACATTTGACAAGNTGGAGAAGAGATAAGGAGACTCGATCTATC  
TGTCGGGCTCAGTGATGTGCTCGGACCTTCTGTGCTGTGAAGGCGAGAGGTG

CACGGACTAAGCTNCTGGCACCTTTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGCTATC  
CNATAGCAATGCCTCTCCTCAGGTNGCCAGATACTCTGGAGTCAAAACCGCN  
GCCTGCGGAGTGTNAAGTCTATCTCAAGCNGGACCCANCNGGCTGTGGCA  
GTGACCGCNGACCATGAGGTNACCTCTACTAAGATAGAGAAGAGGCACACCAT  
TGCCAAATACAATCCTTTCAAGAAATAAGCTGC

## В

ATGAGNCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCNTCCCGTCAGGC  
CCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTGCAGGGAAGAA  
CACCATCTTGGAGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACC  
TCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTGTGTTCACGCTCACCCTGCCAGTGAGC  
GAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGAC  
CCAAACAACATGGACAGAGCAGTNAACNTACAGGAAGCTGAAAGAGAGATA  
ACATTCATGGGGCTAAGGAGGTNGCAGTCACTCACTGGTGCAGCTTGC  
CAGTGTGATGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACNGTGACCACAGAAGTGG  
CTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTGATTACACAGCATCGGT  
CTCAGAGGAGATGGTNACTACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAACAGAA  
TGCTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCTGGATCGAG  
TGAGCAGGACGNCAGGCGCATGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCGAGTGGTG  
CANGCAATGAGAACAAATTTGGGACTCATCTCAGCTCAGTGTGCTGCTGAAAG  
ATGATCNTTCTTGAATTTGCAAGGCTACAGAAACGAATGGGAGTGCAAAATG  
CAGGATTCAAGTGNATCCTCTCTGTTATTCGNCAGATGATGAGGATCTTGC  
ACTTGATTTGTGGATTCTTGTGCTCTTTCTTCAATGNATTTATCGTCGCTNT  
AAATACGCTTTGAAAGAGGCGCTTCTACGGAGGAGTGCTGATGTATGAG  
GGAAGAATATCGNCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGCTCAT  
TTGTC

## С

ATGGCGTCNCAAGGCACCAACGATCNTATGAACAGATGGANACTGGTGGNGA  
NCGCCAGAATGCNACTGAGATCAGAGCATCTGTNGGAAGAATGGTTGGTGAA  
TTGGGAGNTTNTACATACAGATGTGCACTGAACCTCAACAGCAGNACTATGAAG  
GNAGNCTGATCCAGAACAGCATAACAATAGAGAGAATGGTNTCTCTGCACTTG  
ATGAAGNAGGAACAAATACCTGGGAAGAACATCCAGTCCGGGGAGAGACCCN  
AAGAAACTGGAGGTCCAATTTATNGAAGGAGAGACGGAATGGTNGAGAGA  
NCTGATNCTGTATGACAAAGANGANATCAGGAGNATNTGGCGTCAAGCGAACA  
ATGGAGAGAGCGCACTGCTGGTCTNACTCACNTGATGATNTGGCATCCCAAC  
TNAATGATGCCACATACAGAGAACNAGAGCTCTNCTGCTACTGGAATGGAC  
CCCAGATGTGCTCTGATGCAAGGATCACTCTCCNAGGAGATCTGGAGCT  
GCTGGTGCAGCAGTAAAGGGAGTNGGACAAATGGTGTGAGCTAATTCGGAT  
GATAAAGCAGGGGATCAATGATCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAATGGAGGAA  
GAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCTCTCAAGGGGAATCCAAA  
CAGCAGCACAAGAGCAATGATGGATCAAGTGGAGAGGAGAGAGAAATCCTGGG  
AATGCTGAAATTTGAAGATCTCATCTTTCTGGCAGGCTGTCACTCATCTGAGA  
GGATCAGTGGCCATAAGTCTGCTGCTGCTGTGTGTATGGACTTGCNGN  
TGCCAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAAGGNTACTCTCTNCTNGGAATAGANC  
CTTTCCGTCTGCTTCAAAACAGCCAAGTNTTCACTCTNATNAGACCAATGANA  
TCCAGCACAC

Рис. 1. Консенсусные последовательности участков F и M генов вируса болезни Ньюкасла (А), М(В) и NP (С) генов вируса гриппа А.

Черным цветом выделены сайты отжига праймеров, серым – продукты амплификации.

Таблица

Характеристики сконструированных праймеров к М и NS генам вируса гриппа А и F и М генам вируса болезни Ньюкасла

| №               | Обозначение | Направление | Последовательность, 5'-3' | Ожидаемый продукт |
|-----------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------------|
| primer_NDV_1    |             | F           | TACTTTGATTCTGCCCTHCC      | 132 п.о.          |
|                 |             | R           | CTTRCTGTCTGTCCACGA        |                   |
| primer_NDV_2    |             | F           | GACAGCCTGCTATCCCHAT       | 108 п.о.          |
|                 |             | R           | TGGGTGCCNGCTTGAATG        |                   |
| primer_FLU-M_1  |             | F           | GCCCTAAATGGGAATGGA        | 244 п.о.          |
|                 |             | R           | GCCTGTGAGACCGATGCT        |                   |
| primer_FLU-M_2  |             | F           | TGCCCAGTGAGCGAGGAC        | 288 п.о.          |
|                 |             | R           | GCCTGTGAGACCGATGCT        |                   |
| primer_FLU-NP_1 |             | F           | GTCAAGCGAACAATGGAGAA      | 425 п.о.          |
|                 |             | R           | AGACCGTGCCAGAAAGATG       |                   |
| primer_FLU-NP_2 |             | F           | AGCGAACAATGGAGAAGACG      | 405 п.о.          |
|                 |             | R           | CAGGATGAGTGCAGACCGT       |                   |

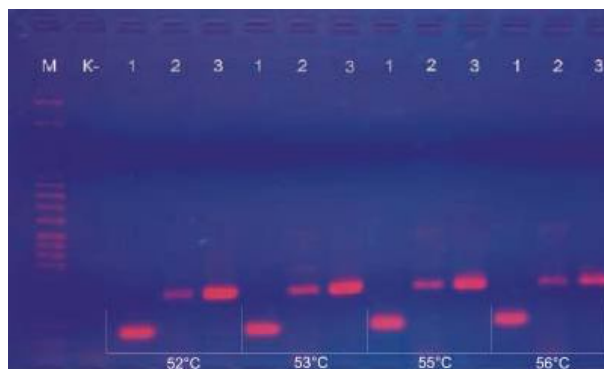


Все сконструированные в лаборатории экологии вирусов ДГП «Институт микробиологии и вирусологии» праймеры к фрагментам консервативной последовательности М генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла, которые охватывают участки геномов в 244 и 132 пар оснований соответственно, протестированы при различных температурно-временных режимах.

ОТ-ПЦР проводили с одновременным использованием в одной реакции праймеров в установленной опытным путем концентрации: 0,5 микромоль при одинаковых условиях ПЦР с изолятами ПМВ-1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06, А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) и А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8). Реакцию проводили в термоциклере при следующих условиях: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (в градиенте температур 52°C, 53°C, 55°C, 56°C, в течение 60 и 30 сек) и удлинение цепи (72°C, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Окончательные результаты испытаний отражены на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, в результате реакции с праймерами к участкам М генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла при температуре отжига 55°C, получены наилучшие результаты с обнаружением специфических продуктов в 132 и 244 пар оснований



Примечание: «М» – ДНК маркер; «К» – отрицательный контроль;

«1» – ПМВ 1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06;

«2» – А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6);

«3» – А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8)

Рис. 2. Электрофореграмма мультиплекс ПЦР с праймерами к М и NS генам вируса гриппа А, F и М генам вируса болезни Ньюкасла при градиенте температур отжига праймеров 52°C, 53°C, 55°C, 56°C и экспозиции 60 и 30 сек.

## Выводы

Разработанная на основе оригинальных казахстанских штаммов тест-система может быть использована в практической ветеринарной вирусологии и эпизоотологии для дифференциальной диагностики вспышек гриппа А и болезни Ньюкасла в ПЦР.

Авторы выражают признательность сотрудникам Национальной лаборатории биотехнологии коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК Момыналиеву К.Т., Шевцову А. и Жолдыбаевой Е. за помощь, оказанную при секвенировании генов казахстанских изолятов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла.

## Литература

1. Саятов М.Х., Жуматов К.Х. Вирусы гриппа птиц и грипп А(H5N1) у человека // Изв. МОН РК, НАН РК. Сер. биол. и мед. - 2005. - №2. - С. 3-9.
2. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Парамиксовирусные инфекции // Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 214-233.
3. Swayne D. Avian Influenza Control Strategies // In: Avian Influenza. Blackwell Publishing. - 2008. - P. 287-299.
4. Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. and Saif Y.M. Diseases of poultry // Iowa State University Press. - 1997. - P. 541-570.





5. World Organisation For Animal Health (OIE) (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [http://www.oie.int/eng/normes/en\\_mmanual.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm).
6. Сафонов Г.А., Володина Л.И. Способ дифференциальной диагностики ортомиксовирусных и парамиксовирусных возбудителей болезней птиц // Авторское свидетельство №539073 от 29.12.1976.
7. Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. et al. Single-Step Multiplex Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection // *Viral Immunology*. - 2004. - Vol. 17. – P. 588-593.
8. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/20-02.5. - 2003. – P. 3-4.

### Түйін

Грипп А вирусының 12 изолятының NP, M және NS гендері мен Ньюкасл ауруы вирусының 4 изолятының F және M гендері секвенделіп, халықаралық деректер қорынан алынған вирустардың еуразиялық желілері гендерінің толық нуклеотид тізбегімен шендестірілді.

Грипп А және Ньюкасл ауруы вирустарын бір мезгілде балауға мультимплекс полимеразды тізбекті реакциясын қою үшін термоциклдеудің бірдей параметрлерінде жұмыс істейтін праймерлер құрастырылды.

Мультимплекс - ПЦР қою үшін праймерлердің сәйкес жұмыс істеуінің оңтайлы температуралы мен уақыт параметрі анықталды.

Жасалған грипп А және Ньюкасл ауруы вирустарын ажыратып балауда мультимплекс полимеразды тізбекті реакциясының жоғары тиімділігі көрсетілді.

### Резюме

Секвенированы NP, M и NS гены 12 изолятов вируса гриппа А, а также F и M гены 4 изолятов вируса болезни Ньюкасла, проведено выравнивание с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов евразийских линий из международных баз данных.

Сконструированы праймеры для постановки мультимплекс ПЦР с целью одновременной диагностики гриппа А и болезни Ньюкасла и отобраны наиболее оптимальные, работающие при одинаковых параметрах термоциклирования.

Установлен оптимальный режим совместимости праймеров с обработкой температурно-временных показателей для постановки мультимплекс - ПЦР.

Показана эффективность мультимплексной ПЦР тест-системы для дифференциальной диагностики гриппа А и болезни Ньюкасла.

### Summary

There were sequenced NP, M and NS genes of 12 AIV isolates and F and M genes of 4 NDV isolates as well. They were aligned with full genome sequences of Eurasian lineage viruses from GenBank.

Specific primers were constructed for simultaneous diagnosing of influenza A and Newcastle disease in multiplex PCR and the most optimum primers working at similar thermocycling parameters have chosen.

Primers compatibility regime is defined by working out optimum temperature-temporal parameters for running multiplex PCR. Efficiency of multiplex PCR for differentiation of influenza A and Newcastle disease has shown.