

УДК 619:616-076:578.825.15

Красочко П.И., аспирант

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,  
г. Витебск

## ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Показаны результаты подбора и синтеза праймеров вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Приведены результаты испытания их специфичности с различными штаммами герпесвирусов животных.*

*Results of design and synthesis of primers for infectious bovine rhinotracheitis were showed. Specificity of this primers were proved with different stamms of herpesviruses of animals.*

В современных условиях в патологии животных вирусные инфекции занимают одно из ведущих мест. Особое место занимает инфекционный ринотрахеит. Это остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся преимущественно катарально-некротическими поражениями дыхательного тракта, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом, а также развитием пустулезного вульвовагинита, при попадании вируса в половые органы животного и абортами.

Проведенные нами серологические исследования крови невакцинированных животных с целью изучения распространения инфекционного ринотрахеита показали, что противовирусные антитела выявляются в среднем у 30,7% обследованных животных, что свидетельствует о высокой степени инфицированности животных вирусом [10].

Заболевание вызывается ДНК-геномным вирусом Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), относящимся к семейству Herpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus [7, 16, 18, ].

Особенностью данного вируса является его длительная персистенция в организме животных после переболевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.). Такие животные являются потенциальным источником распространения заболевания [1, 4, 12].

Для их выявления существует достаточно много чувствительных серологических реакций, с помощью которых можно выявлять специфические противовирусные антитела. Это иммуноферментный анализ, реакции нейтрализации и непрямой гемагглютинации и т.д. Однако с их помощью достаточно сложно выявить животных-вирусоносителей, так как с помощью применяемых методов практически невозможно провести дифференциацию поствакцинальных от постинфекционных специфических антител, так как выявляемые титры антител практически одинаковы. Для дифференциации используют маркерные вакцины, однако их широкое использование ограничено ввиду высокой стоимости биопрепарата и дифференциальных тест-систем. При проведении исследований по выявлению животных-вирусоносителей применяют и вирусывыделение. Это длительный (около 30 дней) и трудоемкий процесс, который не целесообразен при проведении скрининговых исследований [1].

Наиболее перспективными в настоящее время являются молекулярно-генетические методы, в частности, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод основан на применении праймеров (специфических олигонуклеотидов), фланкирующих уникальные последовательности участков нуклеиновой кислоты вируса, по которым можно проводить специфическую идентификацию возбудителя. Преимуществами данного метода являются:

- прямое определение возбудителя, а не продуктов жизнедеятельности возбудителя (например, при ИФА выявляются белки-маркеры, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции);

- высокая чувствительность и специфичность (для ПЦР достаточно 10-100 клеток

возбудителя);

- высокая скорость получения результатов;
- возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций [5, 6, 9, 12, 13].

Целью настоящих исследований являлся подбор праймеров для выявления ДНК возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и определение их специфичности со штаммами герпес-вирусов – возбудителями инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц.

### **Материалы и методы.**

В работе были использованы: вакцинные штаммы вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота КМИЭВ-6, вакцинные штаммы вируса болезни Ауески свиней, ринопневмонии лошадей, ларинготрахеита кур, герпесвирус индеек.

Получение нуклеиновой кислоты вируса проводили с помощью набора для выделения ДНК, разработанный сотрудниками ГНУ «Институт Микробиологии». Принцип метода основан на способности хоотропных солей связываться с молекулами ДНК и адсорбировать их на своей поверхности. Для этого предварительно пробы подвергают взаимодействию с лизирующим буфером (протеолитическим ферментом), после чего вносят сорбент, на который сорбируется ДНК. После взаимодействия полученного раствора и сорбента, комплекс ДНК-сорбент несколько раз промывается буферным раствором и просушивается. Далее вносится буфер для элюции, в результате чего происходит разрушение комплекса и переход ДНК в раствор. После встряхивания и заключительного центрифугирования, супернатант, в котором находится извлекаемая ДНК, переносится в чистую пробирку [2, 3, 8, 14].

Постановка ПЦР проводилась в термоциклере «Eppendorf Mastercycler Personal» (США) по нижеприведенной программе. Первый цикл состоял из первоначальной денатурации при 94°C в течении 2 мин. Далее проводили 35 циклов по схеме: денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг праймеров при 55°C – 30 сек, элонгация при 72°C – 30 сек. После последнего цикла смесь в термоциклере прогревается при 72°C в течении 2 мин для прохождения заключительной элонгации.

Учет результатов проводился путем разгонки продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле (Serva).

Подтверждение специфичности искомого ампликона проводили при помощи рестрикционного анализа. Для этого первоначально провели анализ искомого ампликона на предмет наличия сайтов рестрикции и выбрали соответствующую рестриктазу. После чего подготовили реакционную смесь, состоящую из полученного в ходе ПЦР ампликона, рестриктазы и раствора буфера, специфичного для данной рестриктазы. Полученную реакционную смесь инкубировали в термоциклере при 37°C на протяжении 30 мин. Учет результатов проводили аналогично учету при постановке ПЦР [8, 12, 14]

### **Результаты исследований.**

Исследования по подбору праймеров генома вируса ИРТ проводили в 5 этапов.

На первом этапе проведен анализ генома вируса ИРТ на основе литературных данных (на примере полного генома штамма Соорер).

На втором этапе были установлены высоко консервативные участки генома вируса, к которым подбирались олигонуклеотидные заправки.

На третьем этапе проведен синтез характерных олигонуклеотидных последовательностей вируса ИРТ.

На четвертом этапе проведен выбор наиболее специфичного праймера вируса ИРТ в отношении вакцинных штаммов вируса (КМИЭВ-6).

На пятом этапе проверена специфичность праймера вируса ИРТ в отношении близкородственных герпес-вирусов сельскохозяйственных животных и птиц.

На основании литературных данных, геном вируса ИРТ представлен двуспиральной

молекулой ДНК размером около 136 пар килобаз. Молекула ДНК в свою очередь состоит из длинного уникального сегмента  $U_L$  (около 100 килобаз), внутренних повторов IR (11 килобаз), короткого уникального сегмента  $U_S$  (13 килобаз) и терминальных повторностей TR. Повторности пространственно ориентированы в соответствии друг к другу. Сегмент  $U_S$  располагается между IR и TR, направляется в двух альтернативных направлениях к  $U_L$ . Так, ДНК, выделенная из вирионов, представляется в двух изомерических формах в неравных эквимолярных количествах. Два изомера обозначены как прототипный (P) и инверсионный тип сегмента  $U_S$  [19, 20]. Ничего пока не известно о возможной функции этого подвижного механизма, хотя в отличие от  $U_S$  региона ориентация  $U_L$  региона фиксирована.

При помощи секвенирования было выявлено 67 уникальных генов и два гена, дублированных в инвертированных повторах. Большинство генов вируса проявляют гомологию с генами вируса простого герпеса человека (HSV-1) и встречаются в том же порядке. Около 20 протеинов ВНВ-1 были обследованы физическими методами, а функции других белков были выведены из гомологии последовательностей, кодирующих известные протеины других герпесвирусов (табл.1).

**Таблица 1**

**Протеины, специфичные ВНВ-1 (по M. Schwyzer et al., 1996)**

<b>Функция</b>	<b>Название</b>
Гликопротеин	gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK, gM
Оболочка	UL20, UL34, UL43, UL49.5
Тегумент	UL11, UL36, UL37, UL41 (изолированные белки вириона), UL46, UL47, UL48 (альфа-транс-индуцирующий фактор), UL49, US9
Апсид	UL18, UL19 (мажорный капсидный белок), UL26/26.5 (сывороточная протеаза и ее субстрат), UL35, UL38
Только вирион	UL4, UL21, UL24
Расщепление / упаковывание	UL6, UL15, UL25, UL28, UL32, UL33
Репликация ДНК	UL29 (большая ДНК, связанная с белком), UL30, UL42 (ДНК полимеразы и добавочный белок), UL5, UL8, UL52 (хеликаза/праймаза), LJL9 (оригинальный связующий белок)
Фермент	LJL23 (тимидинкиназа), UL39, UL40 (субъединицы 1 и 2 рибонуклеотидной редуктазы), UL2 (урацил-ДНК-гликозилаза), UL50 (dUTPase), UL13, US3 (протеин киназа), UL12 (ДНКазы)
Регуляторная	ВІСР0, ВІСР4, ВІСР22, ВІСР27
Неизвестная	UL3, UL7, UL14, UL16, UL17, UL31, UL51, US2
ВНВ-1 Специфичность	UL0.5, UL3.5, circ, UL1.5

Геном ВНВ-1 содержит, по крайней мере, 10 генов с потенциальной способностью кодировать гликопротеины. Эти сложные белки играют важную роль в инфекционном процессе и иммунном ответе. Локализуясь на оболочке вириона и на поверхности инфицированных клеток, они представляют собой важные мишени для иммунной системы инфицированного организма. Также они служат медиаторами внедрения вириона в клетку-хозяина, слияния и распространения вируса от клетки к клетке.

На основании вышеизложенного, нами были установлены высоко консервативные

участки генома вируса, к которым подбирались олигонуклеотидные затравки. Данные участки кодируют необходимые для жизнедеятельности вируса гликопротеины (В, С, D, E) и фермент тимидинкиназу. Праймеры подбирались с помощью программы Vector NTI на основе полного генома штамма Cooper [16, 21, 22]. В таблице 2 приведены последовательности праймеров для каждого участка-мишени.

**Таблица 2**

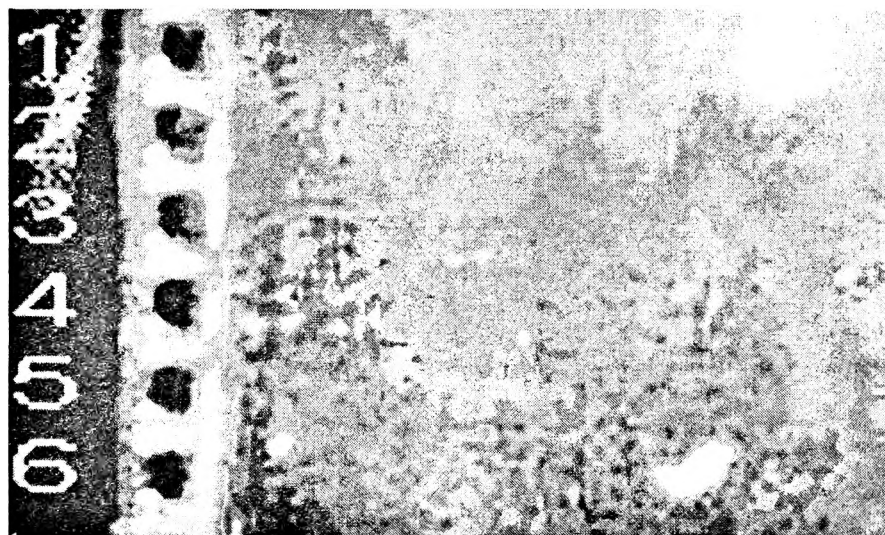
**Выявленные последовательности праймеров генома вируса ИРТ**

№ п/п	Кодируемый гликопротеин/ фермент	Последовательность праймеров
1	Гликопротеин D	Sense (смысловый праймер) GCGAACATGCAAGGGCCGACAT Antisense (антисмысловый праймер) TAATCAGTCCCAGCTCGTCTCGTCCG
2	Гликопротеин В	Sense (смысловый праймер) GGACAGCGTCGTCATCTACG Antisense (антисмысловый праймер) GAAGAAGCGCGAGTTTCCC
3	Гликопротеин С	Sense (смысловый праймер) TAGCCAGTGCCGGTGCAGGTGTAGT Antisense (антисмысловый праймер) TTTCGCGCACGTCCGTCCTTAC
4	Гликопротеин E	Sense (смысловый праймер) CTGCTGCTGCCGCAGTTATTGCTTT Antisense (антисмысловый праймер) TACAGGAAGTACACGCCGCCGT
5	Тимидинкиназа	Sense (смысловый праймер) TCTCCGCGTCGTGCGTATCTACCTG Antisense (антисмысловый праймер) TTGATCTCGCGGAGGCAGTAGC

Синтез праймеров проводили на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов «BIOSET ASM 800» (Био-Рад). Принцип работы автомата-синтезатора представляет собой подачу в реактор с помощью насоса (под контролем микропроцессора) защищенных нуклеотидных компонентов, реагентов и растворителей по заданной программе в колонку, содержащую полимерный носитель с закрепленным на нем первым нуклеозидом. После окончания синтеза и отделения полностью защищенного олигонуклеотида от полимерного носителя проводят деблокирование, очистку и анализ синтезированных фрагментов ДНК. Данный метод является наиболее распространенным методом твердофазного синтеза олигонуклеотидов и основан на использовании нуклеотидного компонента, содержащего фосфор (III). В так называемом амидофосфитном-способе нуклеотидным компонентом является эфир 3'-амидофосфита дезоксинуклеозида. Достаточно устойчивые амидофосфиты при протонировании в присутствии тетразола превращаются в сильные фосфорилирующие агенты. Схема также включает блокирование непрореагировавшей 3'-гидроксигруппы достраиваемого олигонуклеотида (кэпирование) и окисление межнуклеотидного фосфита. После завершения синтеза удаляют защитные группы с межнуклеотидных фосфатов, отделяют олигонуклеотид от носителя, деблокируют группы NH<sub>2</sub> гетероциклов. Липофильную группу (MeO)<sub>2</sub>Tr удаляют после первого хроматографического разделения.

После подбора наиболее специфичного праймера проводили амплификацию с выделенной ДНК вируса ИРТ (штаммы КМИЭВ-6), а в качестве положительного контроля ис-

пользовали эпизоотический штамм «Оренбург». В результате проведенной амплификации и разгонке полученных ампликонов в 2% агарозном геле получили четкую полосу на уровне 490 п.н. для праймеров синтезированных к участку генома, кодирующим гликопротеин D. В отрицательном контроле и остальных парах праймеров амплификация не наблюдалась (рис.1).



**Рисунок 1 - Электрофореграмма продуктов амплификации. Дорожка 1 – 5 продукты амплификации вируса ИРТ штамма КМИЭВ-6 с различными парами праймеров, дорожка 6 – отрицательный контроль (неинфицированная культура клеток)**

Для подтверждения специфичности полученного ампликона был произведен рестрикционный анализ. После воздействия рестриктазы MNL1, на электрофореграмме наблюдались 2 отчетливые полосы на уровне 190 и 300 пар нуклеотидов, как и было нами теоретически предсказано.

Таким образом, в результате проведенных исследований была подобрана пара праймеров к участку генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, кодирующего гликопротеин D.

Праймеры имели следующие последовательности нуклеотидов:

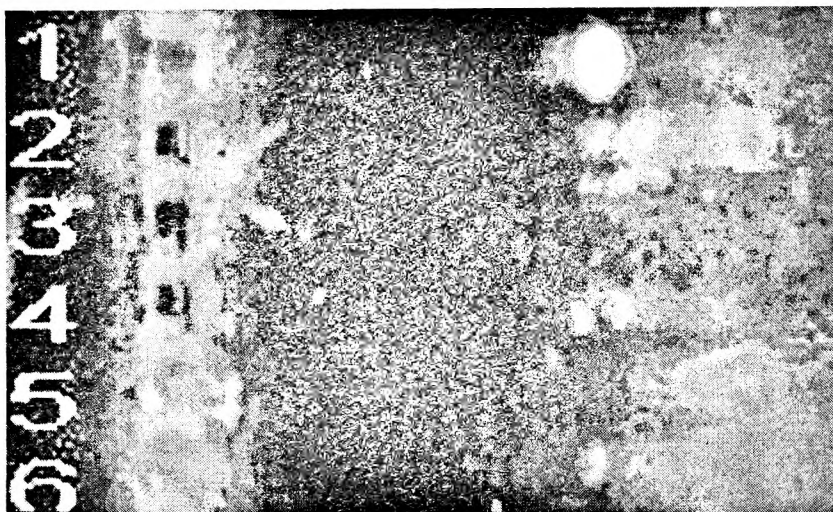
- смысловой – GCGAACATGCAAGGGCCGACAT,
- антисмысловой – TAATCAGTCCCAGCTCGTCCG.

Специфичность синтезированных праймеров проводили в ПЦР с использованием вакцинных штаммов герпес-вирусов сельскохозяйственных животных и птиц (табл. 3 и рис.2).

**Таблица 3**

**Результаты постановки ПЦР синтезированных праймеров с вакцинными штаммами герпес-вирусов сельскохозяйственных животных и птиц**

	Наименование препарата	Результаты ПЦР
1.	вакцинный штамм вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота КМИЭВ-6	+
2.	вакцина против болезни Ауески	-
3.	Отрицательный контроль	-
4.	вакцина против ларинготрахеита птиц	-
5.	вакцина против болезни Марека	-
6.	вакцина против ринопневмонии лошадей	+/-



**Рисунок 2 - Электрофореграмма продуктов амплификации. Дорожка 1 - штамм КМИЭВ-6; дорожка 2 – вакцина против болезни Ауески; дорожка 3 – отрицательный контроль; дорожка 4 - вакцина против болезни Марека; дорожка 5 - вакцина против ларинготрахеита птиц; дорожка 6 – вакцина против ринопневмонии лошадей.**

#### **Обсуждение результатов.**

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в результате проведенных исследований была подобрана пара праймеров, которая специфически амплифицирует фрагмент генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Размер полученного ампликона и его специфичность были подтверждены при помощи элетрофореза и рестрикционного анализа.

Препараты ДНК близкородственных герпес-вирусов, вызывающих болезнь Ауески, ларинготрахеит птиц, болезнь Марека не амплифицируются, что подтверждает специфичность полученных праймеров.

С вирусом ринопневмонии лошадей отмечена частичная амплификация. Это связано с тем, что данные вирусы являются достаточно близкими в антигенном отношении, о чем свидетельствуют научные работы О.Г. Штрауба. В связи с наличием перекрестных серологических реакций и на основании полученных нами результатов, можно предположить о наличии сходной генетической структуры вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и вируса ринопневмонии лошадей.

#### **Выводы.**

1. Получена пара праймеров, подобранных к гену, кодирующему гликопротеин D, для выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и доказана их специфичность.

2. Проведенные исследования продемонстрировали близкое генетическое родство вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и вируса ринопневмонии лошадей.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Красочко, П.А. Болезни сельскохозяйственных животных / П.А. Красочко [и др.]. - Минск: "Бизнесофсет", 2005. – 800 с.
2. Глотов, А.Г. Обнаружение последовательностей бычьего герпесвируса первого типа гибридизацией с биотинилированным ДНК-зондом: тезисы докладов 111 всесоюзной конференции по эпизоотологии (Новосибирск, 24-26 сентября 1991г.)/ ВАСХНИЛ РАСХН ИЭВСидВ / А.Г. Глотов, В.И. Семенихин, С.Ф. Орешкова [и др.]. - Новосибирск, 1991. - С. 222.
3. Глотов, А.Г. Обнаружение ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в сперме клинически здоровых быков-производителей методом молекуляр-

ной гибридизации / А.Г. Глотов // в кн. Методология мероприятий по профилактике и ликвидации болезней сельскохозяйственных животных. – Новосибирск, 1995. – С. 172-177.

4. Глотов, А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк [и др.]. – Новосибирск, 2006. – 196 с.

5. Говорун, В.М. Новые направления в ДНК-диагностике: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: мат. 2-й Всероссийской науч.-практ. конф. (Москва, 20-22 января 1998г.) / А.Г. Глотов – Москва, 1998. – С. 12-13.

6. Гусева, Е.В. Применение ПЦР в диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: Научные основы технологии пром. производства вет. биол. Препаратов: тез. докл. 5-й Всероссийской конф. (Щелково, 14-17 мая ) / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина – Щелково, 1996. – С. 38 – 40.

7. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Е.А. Непоклонов, Е.С. Воронин – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 - 911 с.

8. Морозов, И.А. Дифференциация штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с помощью рестрикционного анализа / И.А. Морозов, А.Ф. Шуляк, С.К. Артюшин [и др.]. // Мол. генет., микробиол. и вирус. – 1991. - №4. – С. 64 – 67.

9. Панин, А.Н. Полимеразная цепная реакция – необходимый инструмент для идентификации и типирования возбудителей инфекционных болезней животных: Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России: сб. матер. науч. сессии РАСХН (к 100-лет. юбилею ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко) / А.Н. Панин, И.Л. Обухов, К.Н. Груздев – Москва, 1998. – С. 313 – 315.

10. Красочко, П.П. Распространение инфекционного ринотрахеита среди крупного рогатого скота в Республике Беларусь: мат. конф. молодых ученых / П.П. Красочко. - Витебск, 2007. – С.155.

11. Belak S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // Vet. Res. Commun.- 1993.- Vol. 17. – P. 55-72.

12. Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // Nord. Veter. Med. – 1978. – Vol. 30, № 4 - 5. - P. 178 – 185.

13. Engels M. Comparison of the genomes of infections bovine rhinotracheitis and infections pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // Arch. Virol. – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174.

14. Fuchs M. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild – type virus and virus lacking glycoprotein E / M. Fuchs, P. Hubert, J. Detterer et al. // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Aug. Vol. 37, №8. – P. 2498 – 2507.

15. Gupta P.K. Cloning and expression of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein C / P.K. Gupta, M. Saini, L.K. Gupta et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1999. – Vol.47 (№2). – P. 275-282.

16. OIE Manual, Manual of Standarts// Chapter 2.3.5. 2000.

17. Rocha M.A. A. nigh sensitivity – nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls / M.A. Rocha, E.F. Barbosa, S.E. Guimaraes et al. // Vet. Microbiol. – 1998. – Aug. 28, Vol. 63, №1. – P. 1 – 11.

18. Roizman B. Family Herpesviridae. / B. Roizman, R.S. Desrosier, B. Fleckenstein / In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.d. (Editors), Virus Taxonomy, 6<sup>th</sup> Rep. Of the Int. Committee on Taxonomy of viruses. Arch. Virol., Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New-York, 1995. - P. 114 - 127.

19. Ros C. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification / C. Ros, S. Belak // J. Clin. Microbiol.- 1999. – Vol.37 (№5). – P. 1247 – 1253.

20. Vilcek S. Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR / S. Vilcek // J. Virol. Methods. – 1993. - Feb. Vol. 41, № 2. – P. 245 – 247.
21. Vilcek S. Rapid detection of bovine herpesvirus – 1 (BHV-1) using the polymerase chain reaction / S. Vilcek, P.F. Nettleton, J.A. Herring et al. // J. Vet. Microbiol. – 1994 в. - Sep. Vol. 42, №1. – P. 53 – 64.
22. Zhou J. Improved detection of bovine herpesvirus –1 in artificially infected bovine semen by protein amplification / J. Zhou, J. Lyaku, R.A. Fredrickson // J. Virol. Methods. – 1999. – May. Vol. 79, №2. – P. 181 –189.