

Moldabekova Elvira Ermekovna – Master's student of the Department of Veterinary Medicine, Master's degree program - 7M091101 "Veterinary Medicine", NAO of the Shakarim University of Semey, 071400 Semey, 71 Yunosti str. Tel. +7 7772946789, e-mail: mk_ellya@mail.ru.

УДК 619:578.832.1:636.1/8:616-079.4
DOI: 10.52269/22266070_2022_4_70

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГРИППА ЛОШАДЕЙ

Өрқара Ш.Д. – магистр ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы.

Сандыбаев Н.Т. – кандидат биологических наук, профессор, директор Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы.

Строчков В.М. – старший научный сотрудник лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы.

Белоусов В.Ю. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Международного центра вакцинологии, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы.

В данной работе представлены результаты по разработке отечественной тест-системы на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для идентификации вируса гриппа лошадей типа А подтипа H3, которую планируется использовать в ветеринарной практике. Возбудителем вируса гриппа лошадей является вирус семейства Orthomyxoviridae Influenza Virus А подтипов H3N8 и H7N7. В результате проведенных исследований были подобраны праймеры Eqlnf-H3F1/Eqlnf-H3R1 с зондом Eqlnf-H3P1 и отработаны условия постановки ПЦР. Оптимизирована температура отжига праймеров в 56 °С и подобрана оптимальная концентрация хлорида магния в 2мМ. Подобраны оптимальные концентрации прямого и обратного праймера в 400/400 нМ а также зонда в 150 нМ. Специфичность и чувствительность протестированы на панели образцов, состоящих из возбудителей как вирусных, так и бактериальных респираторных инфекций. В процессе исследования ложно-положительных, ложно-отрицательных или же сомнительных результатов выявлено не было. Тест-система показала высокую аналитическую чувствительность способную выявлять до 50 фг или $3 \cdot 10^3$ копий геномной РНК, а показатель специфичности к ВГЛ H3 составил 100%. В результате проведенных работ была разработана отечественная диагностическая тест-система для идентификации вируса гриппа лошадей.

Ключевые слова: вирус, грипп лошадей, гемагглютинин, праймеры, лошади, ПЦР в реальном времени.

ЖЫЛҚЫ ТҰМАУЫ ВИРУСЫН ДИАГНОСТИКАЛАУҒА АРНАЛҒАН ПТР ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН ӨЗІРЛЕУ

Өрқара Ш.Д. – ветеринария ғылымдарының магистрі, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының «Жасыл биотехнология және клеткалық инженерия» зертханасының кіші ғылыми қызметкері, Алматы қ.

Сандыбаев Н.Т. – биология ғылымдарының кандидаты, профессор, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университетінің Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының директоры, Алматы қ.

Строчков В.М. – Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының «Жасыл биотехнология және клеткалық инженерия» зертханасының аға ғылыми қызметкері, Алматы қ.

Белоусов В.Ю. – биология ғылымдарының кандидаты, Халықаралық Вакцинология орталығының аға ғылыми қызметкері, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қ.

Бұл жұмыста жылқы тұмауының А типті H3 субтип вирусын анықтау үшін нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакция негізіндегі отандық тест-жүйені өзірлеу нәтижелері көрсетілген, оны ветеринариялық тәжірибеде қолдану жоспарлануда. Жылқы тұмауы вирусының қоздырғышы H3N8 және H7N7 типті Orthomyxoviridae Influenza Virus А отбасының вирусы болып табылады. Зерттеу нәтижесінде Eqlnf-H3P1 зондымен Eqlnf-H3F1/Eqlnf-H3R1 праймерлер таңдалып, ПТР қою шарттары өзірленді. Праймерлердің күйдіру температурасы 56 °С және магний

хлоридінің оңтайлы концентрациясы 2 мМ болып таңдалды. 400/400 нМ түзу және кері праймердің оңтайлы концентрациясы және зондтың концентрациясы 150 нМ болып таңдалды. Арнайлылығы мен сезімталдық вирустық және бактериялық респираторлық инфекциялардың қоздырғыштарынан тұратын үлгілер панелінде тексерілді. Зерттеу барысында жалған-оң, жалған-теріс немесе күмәнді нәтижелер болған жоқ. Тест жүйесі геномдық РНҚ-ның 50 фг немесе $3 \cdot 10^3$ данасын анықтай алатын жоғары аналитикалық сезімталдықты көрсетті, ал арнайлылық көрсеткіші 100% құрады. Жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде жылқы тұмауының вирусін анықтауға арналған отандық диагностикалық тест жүйесі әзірленді.

Түйінді сөздер: вирус, жылқы тұмауы, гемагглютинин, праймер, жылқы, нақты уақыттағы ПТР.

DEVELOPMENT OF A PCR TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF EQUINE INFLUENZA VIRUS

Orkara Sh.D. – Master of Veterinary Sciences, Junior researcher of the laboratory "Green Biotechnology and Cell Engineering", Kazakhstan-Japan innovation centre, Kazakh national agrarian research university, Almaty.

Sandybaev N.T. – Candidate of Biological Sciences, Professor, Director of the Kazakhstan-Japan innovation centre, Kazakh national agrarian research university, Almaty.

Strochkov V.M. – Senior Researcher at the laboratory "Green Biotechnology and Cell Engineering", Kazakhstan-Japan innovation centre, Kazakh national agrarian research university, Almaty.

Belousov V.Yu. – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the International Center for Vaccinology, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty.

This paper presents the results of the development of a domestic test system based on real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for the identification of equine influenza virus type A subtype H3, which is planned to be used in veterinary practice. The causative agent of the equine influenza virus is a virus of the family Orthomyxoviridae Influenza Virus A subtypes H3N8 and H7N7. As a result of the studies, the Eqlnf-H3F1/Eqlnf-H3R1 primers with the Eqlnf-H3P1 probe were selected and the conditions for setting up PCR were worked out. The annealing temperature of the primers was optimized at 56 °C and the optimal concentration of magnesium chloride in 2 mM was selected. Optimal concentrations of forward and reverse primer in 400/400 nM and probe in 150 nM were selected. Specificity and sensitivity were tested on a panel of samples consisting of both viral and bacterial respiratory pathogens. No false-positive, false-negative or questionable results were found during the study. The test system showed high analytical sensitivity capable of detecting up to 50 fg or $3 \cdot 10^3$ copies of genomic RNA, and the index of specificity to H3 EIV was 100%. As a result of the work carried out, a domestic diagnostic test system was developed for the identification of the equine influenza virus.

Key words: virus, equine influenza, hemagglutinin, primers, horses, real-time PCR.

Введение.

В Республике Казахстан коневодство является традиционной и приоритетной отраслью народного хозяйства, которая на современном этапе развивается по всем основным направлениям, наиболее интенсивными из них являются продуктивное и спортивное коневодство.

В настоящее время грипп лошадей рассматривают как трансграничное заболевание, в связи с чем для Республики Казахстан ситуация по эпизоотологической обстановке в сопредельных государствах играет немаловажную роль. Вирус циркулирует в популяции лошадей, но также обладает потенциалом преодолевать видовой барьер, что требует к себе пристального внимания ветеринарных служб.

По оценкам Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО), мировая популяция домашних лошадей составляет более 59 миллионов голов, а мировая коневодческая промышленность оценивается примерно в 300 миллиардов долларов США в год [1, с.2150].

Казахстан, занимает первое место в Евразии по практическому использованию лошадей. Коневодство в Казахстане это одна из быстрорастущих секторов животноводства. поголовье лошадей на начало 2021 года составило 3 млн 118,2 тыс. голов. Рост за год составил 9,3% (на начало 2020 года – 2 млн 852,2 тыс. голов) [2, с.1].

Грипп лошадей (ГЛ) считается наиболее распространенным респираторным заболеванием лошадей во всем мире [3, с.1185–1191]. Смертность обусловлена вторичной бактериальной инфекцией, однако прогноз обычно зависит от индивидуального иммунного статуса. ГЛ очень заразен и имеет несколько путей передачи, включая зараженный инвентарь. Более того, не существует специального лечения, и, несмотря на доступную вакцину, серьезные вспышки болезни продолжают происходить [3, с.1185–1191].

ГЛ вызывается подтипами H7N7 и H3N8 вируса [4, с.47-61]. Они могут преодолевать видовой барьер и вызывать эпизоотическое заболевание у людей, а в последнее время и у собак [5, с.1-12]. Вирус H7N7 поражает сердечную мышцу, тогда как вирус H3N8 является гораздо более серьезным и вызывает системные нарушения, в настоящее время в мире встречается только подтип H3N8, подтип H7N7 в последний раз был зарегистрирован в 1977 году.

Высокая антигенная изменчивость вируса гриппа, способна постоянно накапливать мутации в поверхностных гликопротеинах вируса, что позволяет ему уклоняться от защитного иммунитета хозяина [6, с.460-465]. Вирусологическая защита от ГЛ достигается за счет стимуляции сильного клеточного и гуморального иммунитета у вакцинированных лошадей. Однако, несмотря на обновления вакцин на протяжении многих лет, ГЛ остается актуальным, так как высокая антигенная изменчивость вируса преодолевает защитные эффекты вакцин и допускает субклинические инфекции, которые облегчают передачу в восприимчивые группы [7, с.1-18].

Своевременная идентификация инфекционного агента является первым шагом для успешной борьбы с заболеванием. Молекулярно-генетические методы диагностики на основе ПЦР в настоящее время считаются наиболее актуальными способами выявления возбудителя заболевания [8, с.3-8].

Анализ государственного реестра ветеринарных препаратов и кормовых добавок (по состоянию на 01 августа 2022 года) Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК показал, что в Казахстане на настоящее время не зарегистрированы ПЦР тест-системы для диагностики гриппа лошадей.

Целью данной работы было создание диагностической тест-системы для идентификации вируса гриппа лошадей. Разработка ПЦР тест-системы в режиме реального времени для выявления ВГЛ позволит Казахстану иметь в своем арсенале отсутствующие в ветеринарной практике актуальные диагностические наборы.

Ожидаемый экономический эффект заключается, в том, что диагностическая тест-система будет способствовать снижению экономического ущерба от данного заболевания, что в конечном итоге приведет к улучшению эпизоотического благополучия Республики Казахстан по болезням лошадей.

Материалы и методы исследований.

Исследования проведены в период 2021-2022 гг., на базе лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра при НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет» г. Алматы. Объектом исследования служили геномные последовательности вируса гриппа лошадей.

Анализ геномов и подбор праймеров.

Специфические праймеры и зонды (TaqMan пробы), пригодные для разработки ПЦР-РВ, подбирали с помощью онлайн приложения Integrated DNA Technology PrimerQuest™ Tool.

Выделение РНК вируса.

В исследованиях использовали штаммы А/Лошадь/Алматы/24/07 (H3N8), А/Лошадь/Алматы/26/07 (H3N8), А/Лошадь/Алматы/27/07 (H3N8), А/Лошадь/ЮКО/236/12 (H3N8) любезно предоставленные ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии» г. Алматы. Экстракцию РНК вируса производили с помощью набора GeneJet Viral DNA/RNA Purification kit, в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту экстрагированной общей РНК определяли путем измерения коэффициента поглощения при длине волны 260 нм на 280 нм с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Синтез кДНК.

Для синтеза кДНК использовали коммерческий набор «РЕВЕРТА-Л». Согласно инструкции производителя.

Для определения типовой принадлежности вируса гриппа использовали праймеры рекомендованные Международным эпизоотическим бюро (МЭБ), M-F25 (AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG) M-R124 (TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG) [9, с. 3256-3260].

Оптимизация условий ПЦР.

Для оптимизации условий ПЦР использовали амплификатор StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems, США). Подбор оптимальной температуры отжига праймеров проводили в градиенте температур от 52 °С до 62 °С с шагом в два градуса. Оптимизацию концентрации ионов магния проводили в градиенте от 1 до 4 мМ с шагом в 0,5 мМ.

Оптимизацию концентрации праймеров проводили, варьируя их соотношения в реакционной смеси в диапазоне от 50 до 800 нМ с шагом в 50, 100 и 200 нМ. Для оптимизации концентрации зонда были протестированы концентрации в диапазоне от 50 до 250 нМ.

Специфичность праймеров оценивали на 8 образцах вирусных и бактериальных штаммов и изолятов, постановку реакции проводили по оптимизированным условиям ПЦР.

Чувствительность оценивали на контрольном образце А/Лошадь/Алматы/24/07 (H3N8) в десятикратном разведении. Для установления предела обнаружения ПЦР были приготовлены 10-кратные разведения 5 нг/мкл геномной РНК, исследования выполнялись в трех повторах.

Результаты исследований и обсуждение.

Для разработки ПЦР-РВ была выбрана технология TaqMan, как наиболее надежная и часто используемая для идентификации не только ВГЛ, но и других микроорганизмов. В качестве мишени для разработки ПЦР на грипп лошадей был выбран ген гемагглютинаина, позволяющий специфически идентифицировать ВГЛ.

На первом этапе, при отработке ПЦР, было необходимо подобрать специфические праймеры и зонды на исследуемую инфекцию. С этой целью проводили сравнительный анализ полных геномов вируса гриппа лошадей.

Анализ геномов и подбор праймеров. Анализ нуклеотидных последовательностей гена HA (гемагглютинин) ВГЛ, для получения консенсусной последовательности и поиска консервативных участков, с целью дальнейшего подбора праймеров и зондов, проводили с использованием базы данных по гриппу – NCBI – Influenza Virus Resource.

На данном ресурсе, по критериям поиска, проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для визуализации и получения консервативных участков HA с целью дальнейшего подбора специфических праймеров и зондов (рисунок 1,2). Выбранными критериям поиска служили – тип А вирус гриппа, тип хозяина – лошади, страна – любая, сегмент – HA-ген, подтип вируса – H3. В результате поиска, в базе данных найдены 249 нуклеотидных последовательностей, после удаления идентичных из общего числа – 211.

211 nucleotide sequences after collapsing (249 total)

Accession	Length	Host	Segment	Subtype	Country	Region	Date	Virus name	Mutations	Age	Gender	Lineage	VacStr	Complete	#
AX018718	1698	Equine	4 (HA)	H3N8				Equine influenza virus H3N8						c	
BD244629	1762	Equine	4 (HA)	H3N8				Equine influenza virus H3N8						c	
BD244631	1762	Equine	4 (HA)	H3N8				Equine influenza virus H3N8						c	
CS287777	1698	Equine	4 (HA)	H3N8				Equine influenza virus H3N8						c	
MK880355	1706	Equine	4 (HA)	H3N8	China	N	2018/11/20	Influenza A virus (A/Donkey/China/LC/2018)						c	4
MH796257	1716	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2007/12/21	Influenza A virus (A/Equus caballus/Arkhangai/2/2007)						c	
MH796265	1704	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2007/12/08	Influenza A virus (A/Equus caballus/Tuv/3/2007)						c	2
MH796273	1713	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2007/12/08	Influenza A virus (A/Equus caballus/Tuv/4/2007)						c	
MK690099	1762	Equine	4 (HA)	H3N8	USA	N	2018/08/23	Influenza A virus (A/Equus caballus/USA/149632/2018)						c	
MK690123	1762	Equine	4 (HA)	H3N8	USA	N	2018/08/28	Influenza A virus (A/Equus caballus/USA/154390/2018)						c	
MH796281	1716	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2011/07/05	Influenza A virus (A/Equus caballus/Ulaanbaatar/1/2011)						c	
MH796282	1715	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2013/07/04	Influenza A virus (A/Equus caballus/Ulaanbaatar/1201/2013)						c	
MH796290	1710	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2013/07/04	Influenza A virus (A/Equus caballus/Ulaanbaatar/1202/2013)						c	
MH796298	1768	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2013/07/04	Influenza A virus (A/Equus caballus/Ulaanbaatar/1203/2013)						c	
MH796313	1705	Equine	4 (HA)	H3N8	Mongolia	N	2011/07/05	Influenza A virus (A/Equus caballus/Ulaanbaatar/2/2011)						c	4
MT212086	1761	Equine	4 (HA)	H3N8	USA	N	2019/09/13	Influenza A virus (A/Equus ferus						c	

Рисунок 1 – Нуклеотидные последовательности гена-HA ВГЛ по базе данных NCBI

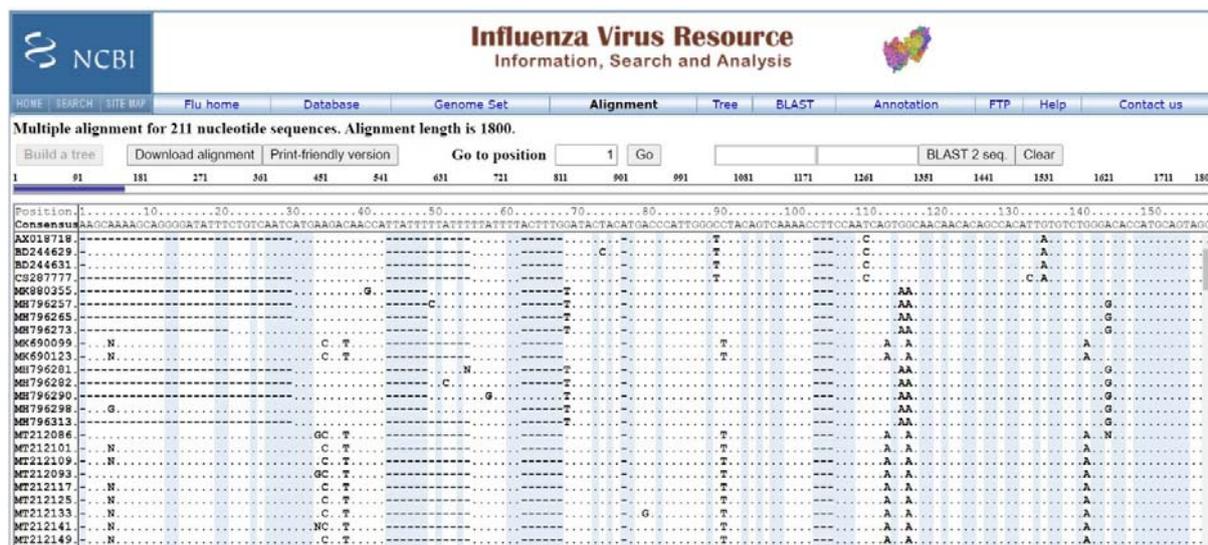


Рисунок 2 – Множественное выравнивание 211 нуклеотидных последовательностей H3-гена ВГЛ и консервативная последовательность для дальнейшего подбора праймеров и зондов

В результате была получена консенсусная нуклеотидная последовательность гена HA ВГЛ, а также FASTA-файл множественного выравнивания данного гена, которые использовались в дальнейших экспериментах по подбору специфических праймеров и зондов, а также проверки их специфичности.

Подбор специфических праймеров и зондов для проведения ПЦР-РВ.

Специфические праймеры и зонды (TaqMan), используемые для идентификации исследуемых возбудителей подбирали с использованием различных компьютерных программ.

В качестве критерия поиска праймеров и зондов использовали следующие общепринятые параметры:

1. Температура плавления (Tm) – праймеры 55-60 °С, зонд на 10 °С выше, чем Tm праймеров.
2. Длина – 18-28 оснований.
3. Содержание GC – 40-60%.
4. Длина ПЦР продукта – 50-150 п.н.
5. Отсутствие вторичных структур и самокомплементарных участков.

Специфичность была проверена с помощью Nucleotide BLAST, для идентификации гена H3 ВГЛ были отобраны 2 набора специфических праймеров и зондов для проведения ПЦР-РВ (таблица 1). Зонды метили красителями FAM и TAMRA.

Таблица 1 – Характеристики специфических праймеров и зондов для обнаружения гена H3 ВГЛ методом ПЦР-РВ, полученные с помощью приложения «Integrated DNA Technology PrimerQuest Tool»

Название	Нуклеотидная последовательность	Старт	Направление	Длина, оснований	Tm
Набор праймеров и зонда 1: Размер ампликона = 150 п.н.					
Eqlnf-H3F1	GAGGTCAATCAGGCAGGATAAG	752	прямой	22	62.11
Eqlnf-H3R1	TGGGTGCATCTGATCTCATTAC	901	обратный	22	62.04
Eqlnf-H3P1	AATGGCAACTTAGTTGCACCGCG	823	зонд	23	67.93
Набор праймеров и зонда 2: Размер ампликона = 100 п.н.					
Eqlnf-H3F2	CACAGCAGAGGGATTACAT	441	прямой	20	61.95
Eqlnf-H3R2	CCAATTCAGTCGGCTAAAGAAAC	540	обратный	23	61.98
Eqlnf-H3P2	CCAATTCAGTCGGCTAAAGAAAC	478	зонд	24	68.49

Синтез кДНК. Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор реагентов «РЕВЕРТА-Л» согласно инструкции производителя. Реакционная смесь составляла 20 мкл, в 10 мкл реакционной смеси вносили 10 мкл РНК-пробы. Инкубировали в течении 30 минут при 37 °С.

При определении типовой принадлежности вируса гриппа согласно рекомендуемым МЭБ праймерам был идентифицирован вирус гриппа типа А.

Оптимизация условий ПЦР.

При проверке работоспособности праймеров для отбора наиболее подходящей пары, задавали стандартные параметры термоциклирования и концентрации реагентов. При стандартных условиях оценки пригодности, наибольший уровень флуоресценции (Rn) и наименьший показатель количества циклов реакции (Ct) продемонстрировала пара праймеров Eqlnf-H3F/R1 с зондом Eqlnf-H3P1, рисунок 3, которые были взяты за основу разработки тест-системы.

Начальным этапом при оптимизации условий ПЦР является определение оптимальной температуры отжига праймеров, рисунок 3. Повышенная температура отжига может приводить к плохому связыванию праймеров с матрицей ДНК, пониженная температура отжига в свою очередь, может приводить к неспецифическому связыванию и появлению неспецифических продуктов амплификации.

Для определения температуры отжига, отобранных пар праймеров, проводили ПЦР в реальном времени в градиенте от 52 °С до 62 °С с шагом в 2 градуса. Как видно из рисунка 3, флуоресцентный сигнал хорошо наблюдался при использовании температур 56 °С и 58 °С, однако при температуре 56 °С значение Ct было наименьшим, что полагало выбрать данную температуру как оптимальную при дальнейших исследованиях.

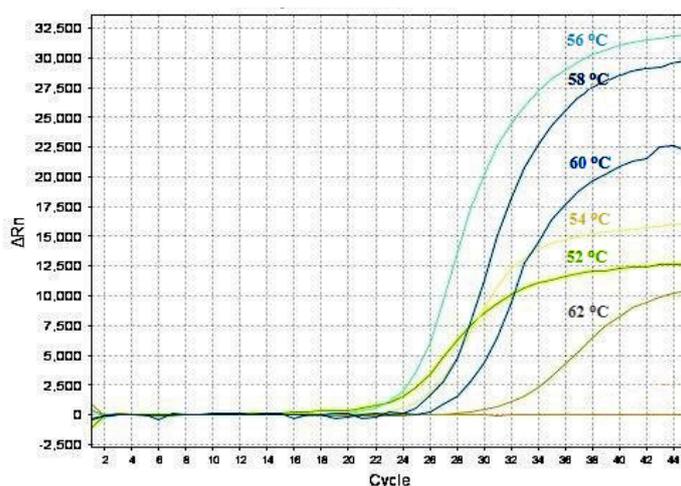


Рисунок 3 – Оптимизация температуры отжига праймеров

Следующий шаг оптимизация концентрации ионов магния. Определение оптимальной концентрации ионов магния играет важную роль при постановке ПЦР реакции, которая обеспечивает правильное функционирование ДНК-полимеразы. Большая концентрация ионов магния может приводить к нежелательным ложноположительным результатам. Так как магний играет роль кофактора для всех типов полимераз [7, с.1-18]. Следовательно, концентрация магния оказывает влияние как на специфичность, так и на выход ПЦР, поскольку магний влияет на гибридизацию праймера с мишенью. Недостаточное количество ионов магния приводит к плохому выходу из-за низкой скорости полимеризации ДНК-полимеразы, нарушенного связывания праймера и неэффективного расщепления зонда. Если концентрация магния слишком высока, то специфичность реакции будет нарушена, поскольку это приведет к большей стабильности неспецифической гибридизации праймеров и появлению ложных результатов. Для определения оптимальных концентрации магния использовали градиент от 1 до 4 мМ с шагом в 0,5 мМ.

Оптимальную концентрацию выявляли на основе того, где в процессе амплификации наблюдалось наименьшее значение C_t и наибольшее значение флуоресцентного сигнала. При оптимизации концентрации ионов магния, использование концентрации 2 мМ показало наилучшие результаты амплификации. 2 мМ было выбрано как оптимальное значение при дальнейших исследованиях.

Дальнейшим этапом являлось, определение оптимальной концентрации праймеров. Переизбыток праймеров в реакционной смеси ПЦР приводит к тому, что они с большей вероятностью связываются с частично комплементарным праймером, чем с полностью комплементарной ДНК матрицей [10, с.825-835]. Исходя из этого при разработке тест-систем следует точно определять их концентрацию. Для разведения праймеров использовали рабочую концентрацию 10 мМ. Для исследования готовили следующие концентрации от 50 до 800 нМ. Результаты оптимизации концентрации праймеров показаны на рисунке 4.

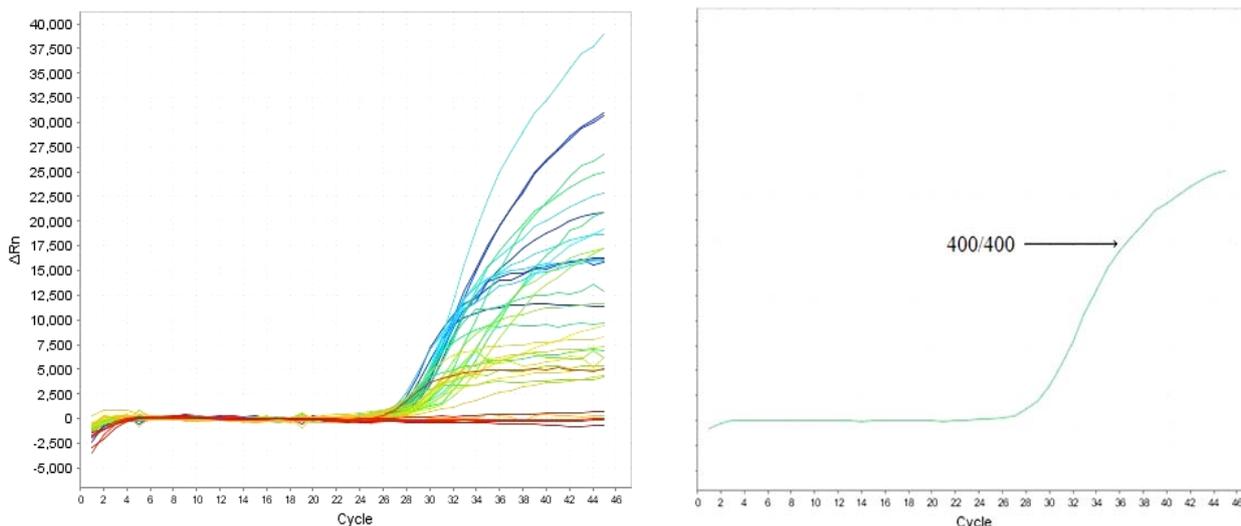


Рисунок 4 – Оптимизация концентрации праймеров EqlnfH3-F1/EqlnfH3-R1

По полученным данным, выявлено что, использование обратного и прямого праймера в концентрации 400 нМ является наилучшим соотношением при постановке ПЦР реакции, где флуоресцентный сигнал начинался раньше и показатель плато был выше.

Отработка концентрации зонда. Для оптимизации условий работы зонда, были протестированы различные концентрации, в пределах от 50 до 250 нМ с шагом в 50 нМ. В результате амплификации при использовании концентрации 150 нМ значения Ct были наименьшими, а показатель Rn был наибольшим, при использовании 200 нМ также нарабатывался специфический продукт, но с меньшими показателями. Исходя из полученных результатов, были подобраны оптимизированные условия постановки ПЦР реакции, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – Оптимизированные условия постановки ПЦР-РВ

Наименование праймеров	Оптимальная температура отжига праймеров	Оптимальная концентрация ионов магния	Оптимальная концентрация соотношения праймеров	Оптимальная концентрация соотношения зонда Eqlnf-H3-P1
Eqlnf-H3F1 Eqlnf-H3R1	56 °C	2 м	400/400 нМ	150нМ

На основе отработанных условий постановки ПЦР были протестированы специфичность и чувствительность тест-системы. Специфичность ПЦР тест-системы была исследована с использованием штаммов вирусов семейства Orthomyxoviridae и других возбудителей респираторных инфекции лошадей. Список штаммов указан в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка специфичности ПЦР тест-системы

Возбудители	Вызываемые ими заболевания	Результаты ПЦР амплификации
Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/24/07 (H3N8)	Грипп лошадей	положительно
Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/26/07 (H3N8)	Грипп лошадей	положительно
Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/27/07 (H3N8)	Грипп лошадей	положительно
Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/ЮКО/236/12 (H3N8)	Грипп лошадей	положительно
Вирус гриппа птиц Avian influenza H5N8	Грипп птиц	отрицательно
Вирус гриппа птиц Avian influenza H9N2	Грипп птиц	отрицательно
Бактерии Rhodococcus equi	Бронхопневмония жеребят	отрицательно
Бактерии Streptococcus equi	Мыт, респираторное заболевание лошадей	отрицательно

При оценке специфичности тест-системы, ложноположительных или же сомнительных результатов выявлено не было. Тест-система показала абсолютную специфичность для штаммов ВГЛ. Результаты проведенного тестирования показаны на рисунке 5.

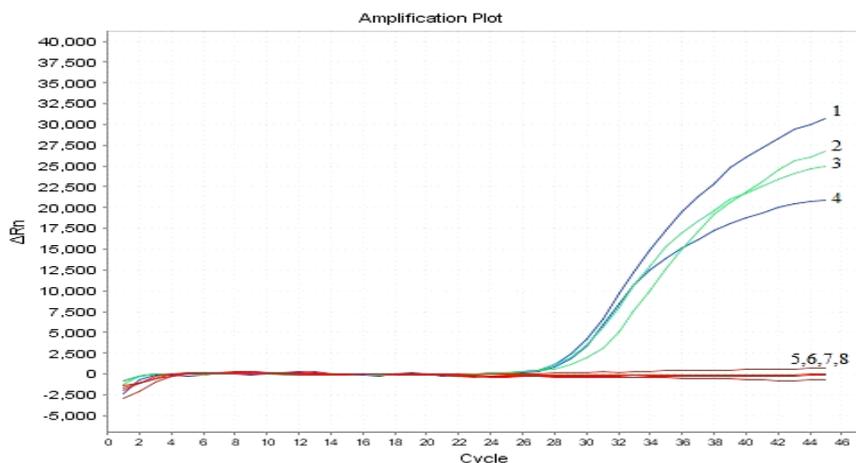


Рисунок 5 – Результаты оценки специфичности.

- №1 - Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/ 24/07 (H3N8);
- №2 - Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/26/07 (H3N8);
- №3 - Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/Алматы/ 27/07 (H3N8);
- №4 - Штамм вируса гриппа лошадей А/Лошадь/ЮКО/ 236/12 (H3N8);
- №5 - Вирус гриппа птиц Avian influenza H5N8;
- №6 - Вирус гриппа птиц Avian influenza H9N2;
- №7 - Бактерии Rhodococcus equi;
- №8 - Бактерии Streptococcus equi.

Чувствительность оценивали с использованием штамма А/Лошадь/Алматы/24/07. Были приготовлены 10-кратные разведения из 5 нг/мкл геномной РНК. Исследования показали, что тест-система идентифицирует РНК возбудителя вируса гриппа лошадей в разведении 10^{-5} , что соответствует 50 фг или $3 \cdot 10^3$ копий геномной РНК (рисунок 6).

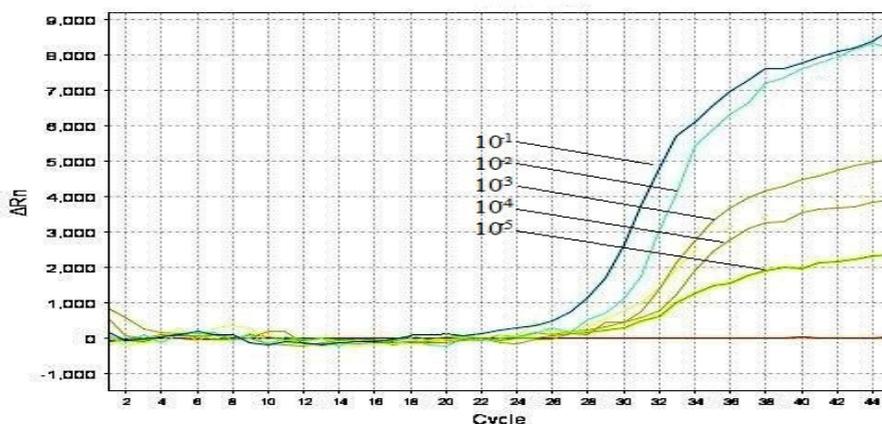


Рисунок 6 – Оценка чувствительности тест-системы

Заключение

Таким образом, в ходе данной работы был проведен компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей и геномов вируса гриппа лошадей для поиска консервативных участков. Подобраны специфические праймеры и зонд, пригодные для постановки ПЦР-РВ. Были подобраны оптимальные условия постановки реакции ПЦР-РВ. Оптимизирована температура отжига праймеров, которая составила 56°C . Подобрана оптимальная концентрация ионов магния в 2 мМ. Подобраны оптимальные значения праймеров в соотношении 400/400 нМ обратного и прямого праймера, а также концентрации зонда в 150 нМ. Проведена оценка чувствительности и специфичности тест-системы, в ходе которой диагностическая тест-система показала высокую аналитическую чувствительность способную выявлять до 50 фг или $3 \cdot 10^3$ копий геномной РНК, а показатель специфичности к ВГЛ Н3 составил 100%. Разработанная тест-система позволит точно идентифицировать вирус гриппа лошадей.

Финансирование

Исследования проведены в рамках программно-целевого финансирования МСХ РК на 2021-2023 годы (ИРН: BR10764975) «Разработать и предложить для производства методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибиреязвенных очагов» на 2021-2023 годы по задаче «Разработать ПЦР для диагностики гриппа лошадей, хеликобактериоза, родококкуса екви, мыта лошадей».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Knox A., Beddoe T. **Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for the Detection of Equine Viral Pathogens** [Text] / A. Knox., T. Beddoe // *Animals* – 2021. – 11. P.2150.
2. **Численность лошадей в Казахстане находится на шестом месте в мире** [Электронный ресурс] // *eldala.kz*. Режим доступа: <https://eldala.kz/novosti/zhivotnovodstvo/3989-po-chislennosti-loshadej-kazahstan-nahoditsya-na-shestom-meste-v-mire> – 01.02.2021.
3. Sack A., Cullinane A., Daramragchaa U., Chuluunbaatar M., Gonchigoo B., Gray G.C. **Equine Influenza Virus A Neglected, Reemergent Disease Threat** [Text] / A. Sack, A. Cullinane, U. Daramragchaa, M. Chuluunbaatar, B. Gonchigoo, G.C. Gray // *Emerg. Infect. Dis* – 2019. – 25. P. 1185-1191.
4. Olguin Perglione C, Golemba MD, Torres C, Barrandeguy M. **Molecular Epidemiology and Spatio-Temporal Dynamics of the H3N8 Equine Influenza Virus in South America** [Text] / C. Olguin Perglione, MD. Golemba, C. Torres, M. Barrandeguy // *Pathogens* – 2016. – 16 P.47-61.
5. Wang C, Wang Q, Hu J, Sun H, Pu J, Liu J, Sun Y. **A Multiplex RT-PCR Assay for Detection and Differentiation of Avian-Origin Canine H3N2, Equine-Origin H3N8, Human-Origin H3N2, and H1N1/2009 Canine Influenza** [Text] / C. Wang, Q. Wang, J. Hu, H. Sun, J. Pu, J. Liu, Y. Sun // *PLoS One* – 2017. P.1-12.
6. Suchitra Rao, Ann-Christine Nyquist, Paul C. Stillwell MD. **27 - Influenza, Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Ninth Edition)** [Text] / Rao. Suchitra, Nyquist Ann-Christine, C. Paul. MD. Stillwell // Elsevier – 2019. – P. 460-465.

7. **Chambers TM. Equine Influenza** [Text] / TM. Chambers // Cold Spring Harb Perspect Med – 2022. P.1-18.
8. **Даугалиева А.Т., Мусаева А.К., Айткулова А. Молекулярно-генетическое исследование возбудителя бруцеллеза, циркулирующего на территории РК** [Текст] / А.Т. Даугалиева, А.К. Мусаева, А. Айткулова // 3i: интеллект, идея, инновация. – Костанай. – КПУ им. А. Байтурсынова. – 2021. С.3-8.
9. **Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes** [Text] / E. Spackman, DA. Senne, TJ. Myers, LL. Bulaga, LP. Garber, ML. Perdue, K. Lohman, LT. Daum, DL. Suarez // J Clin Microbiol – 2002. P.3256-3260.
10. **Green MR, Sambrook J. Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays** [Text] / MR. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harb Protoc – 2018. P.825-835.

REFERENCES:

1. **Knox A., Beddoe T. Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for the Detection of Equine Viral Pathogens** [Text] / A. Knox., T. Beddoe // Animals – 2021. – 11. P.2150.
2. **Chislenost' loshadej v Kazahstane nahoditsya na shestom meste v mire [Elektronnyj resurs]** // eldala.kz. Rezhim dostupa: <https://eldala.kz/novosti/zhivotnovodstvo/3989-po-chislenosti-loshadej-kazahstan-nahoditsya-na-shestom-meste-v-mire> – 01.02.2021.
3. **Sack A., Cullinane A., Daramragchaa U., Chuluunbaatar M., Gonchigoo B., Gray G.C. Equine Influenza Virus A Neglected, Reemergent Disease Threat** [Text] / A. Sack, A. Cullinane, U. Daramragchaa, M. Chuluunbaatar, B. Gonchigoo, G.C. Gray // Emerg. Infect. Dis – 2019. – 25. P. 1185-1191.
4. **Olguin Perglione C, Golemba MD, Torres C, Barrandeguy M. Molecular Epidemiology and Spatio-Temporal Dynamics of the H3N8 Equine Influenza Virus in South America** [Text] / C. Olguin Perglione, MD. Golemba, C. Torres, M. Barrandeguy // Pathogens – 2016. – 16 P.47-61.
5. **Wang C, Wang Q, Hu J, Sun H, Pu J, Liu J, Sun Y. A Multiplex RT-PCR Assay for Detection and Differentiation of Avian-Origin Canine H3N2, Equine-Origin H3N8, Human-Origin H3N2, and H1N1/2009 Canine Influenza** [Text] / C. Wang, Q. Wang, J. Hu, H. Sun, J. Pu, J. Liu, Y. Sun // PLoS One – 2017. P.1-12.
6. **Suchitra Rao, Ann-Christine Nyquist, Paul C. Stillwell MD. 27 - Influenza, Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Ninth Edition)** [Text] / Rao. Suchitra, Nyquist Ann-Christine, C. Paul. MD. Stillwell // Elsevier, 2019, P. 460-465.
7. **Chambers TM. Equine Influenza** [Text] / TM. Chambers // Cold Spring Harb Perspect Med – 2022. P.1-18.
8. **Daugalieva A.T., Musaeva A.K., Ajtkulova A. Molekulyarno-geneticheskoe issledovanie vobzuditelya brucelleza, cirkuliruyushchego naterritorii RK** [Текст] / А.Т. Daugalieva, А.К. Musaeva, А. Ajtkulova // 3i: интеллект, идея, инновация. – Костанай. – КРУим. А. Байтурсынова. – 2021. С.3-8.
9. **Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes** [Text] / E. Spackman, DA. Senne, TJ. Myers, LL. Bulaga, LP. Garber, ML. Perdue, K. Lohman, LT. Daum, DL. Suarez // J Clin Microbiol – 2002. P.3256-3260.
10. **Green MR, Sambrook J. Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays** [Text] / MR. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harb Protoc – 2018. P.825-835.

Сведения об авторах:

Өрқара Шыңғыс Дулатбекұлы – магистр ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, пр. Абая 8, тел. +77473784010; e-mail: chingism@mail.ru.

Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич – кандидат биологических наук, профессор, директор Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, пр. Абая 8, тел. +77783122058; e-mail: nurlan.s@kaznaru.edu.kz.

Строчков Виталий Михайлович – старший научный сотрудник лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, пр. Абая 8, тел. +77757104136; e-mail: vitaliy.strochkov@kaznaru.edu.kz.

Белоусов Вячеслав Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Международного центра вакцинологии, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, пр. Абая 8, тел. +77776567655, e-mail: belousov@tree-gene.com.

Өрқара Шыңғыс Дулатбекұлы – ветеринария ғылымдарының магистрі, Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының "Жасыл биотехнология және клеткалық инженерия" зертханасының кіші ғылыми қызметкері, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қаласы, Абай даңғылы 8, тел. +77473784010; e-mail: chingism@mail.ru.

Сандыбаев Нұрлан Тамамбайұлы – биология ғылымдарының кандидаты, профессор, Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының директоры, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қ., Абай даңғылы 8, тел. +77783122058; e-mail: nurlan.s@kaznaru.edu.kz.

Строчков Виталий Михайлович – Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының "Жасыл биотехнология және клеткалық инженерия" зертханасының аға ғылыми қызметкері, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қаласы, Абай даңғылы 8, тел. +77757104136; e-mail: vitaliy.strochkov@kaznaru.edu.kz.

Белоусов Вячеслав Юрьевич – биология ғылымдарының кандидаты, Халықаралық Вакцинология орталығының аға ғылыми қызметкері, Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қ., Абай даңғылы 8, тел. +77776567655, e-mail: belousov@tree-gene.com.

Orkara Shynggys Dulatbekuly – Master of Veterinary Sciences, Junior researcher of the laboratory "Green Biotechnology and Cell Engineering" of the Kazakhstan-Japan Innovation Center, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, 8 Abaya Ave., tel. +77473784010; e-mail: chingism@mail.ru.

Sandybaev Nurlan Tamambayevich – Candidate of Biological Sciences, Professor, Director of the Kazakhstan-Japan Innovation Center, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, 8 Abaya Ave., tel. +77783122058; e-mail: nurlan.s@kaznaru.edu.kz.

Strochkov Vitaly Mikhailovich – Senior Researcher at the laboratory "Green Biotechnology and Cell Engineering" of the Kazakhstan-Japan Innovation Center, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, 8 Abaya Ave., tel. +77757104136; e-mail: vitaliy.strochkov@kaznaru.edu.kz.

Vyacheslav Yurievich Belousov – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the International Center for Vaccinology, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, 8 Abaya Ave., tel. +77776567655, e-mail: belousov@tree-gene.com.

УДК 636.22/28.082

DOI: 10.52269/22266070_2022_4_79

МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН И УРОВЕНЬ ГОРМОНОВ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ КРАСНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Сейдахметов Б.С. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологии воспроизведения сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИплем, п. Лесные Поляны, Московская область.

Абилов А.И. – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБНУ ФИЦ имени академика Л.К. Эрнста, профессор ВНИИплем.

Дунин М.И. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биологии воспроизведения сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИплем, п. Лесные Поляны, Московская область.

Шеметюк С.А. – соискатель ФГБНУ ФИЦ имени академика Л.К. Эрнста.

Проведены исследования состояния минерального обмена, уровня ферментов, а также содержания эндогенных гормонов, таких как тестостерон, эстрадиол, кортизол, тироксин, у быков-производителей отечественной красно-пестрой породы в возрасте 2-11 лет, в количестве 8 голов в день взятия семени в условиях Черноземной зоны РФ (Воронежской области). Исследования выполнены сотрудниками ФГБНУ ВНИИплем на базе холдинга АО «ГЦВ» и АО «Племпредприятие «Воронежское» с использованием современного оборудования и реактивов (биохимический анализатор Chem-Well-2902, Awareness Technology Inc., США; атомно-абсорбционный спектрометр Квант-2А, Россия; анализатор иммуноферментных реакций Униплан АИФР-01, ЗАО «Иммунотех», Россия). Эндогенные гормоны определяли в двукратной повторности. Установлено, что возраст влияет на уровень ферментов в организме животных. С возрастом увели-