**Министерство образования и науки Кыргызской Республики**

**Кыргызский национальный аграрный университет**

**имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.11.037

На правах рукописи

**УДК 619:578.821.21**

**Орозов Жайлообек Чоконович**

**Оптимизация полимеразной цепной реакции**

**при диагностике оспы овец**

06.02.02. - ветеринарная микробиология, вирусология,

эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Авторефератдиссертации

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**БИШКЕК – 2013**

Диссертационная работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева, на базе закрытого акционерного общества "Алтын-Тамыр" и неблагополучных по оспе овец фермерских хозяйств Кыргызской Республики.

**Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук,

член-корреспондент

Национальной Академии

Наук Кыргызской Республики, профессор

**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович**

**Официальные оппоненты**: доктор медицинских наук, профессор

**Усманов Рафик Каримович**

кандидат биологических наук

**Кошеметов Жумагали Каукарбаевич**

**Ведущая организация:** Казахский национальный аграрный университет, г Алматы, Республика Казахстан

Защита диссертации состоится " " сентября 2013 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д.06.11.037 при КНАУ им. К.И.Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, г.Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

Автореферат разослан "\_\_\_\_" \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2013 г.

**Ученый секретарь**

**диссертационного совета,**

**кандидат ветеринарных наук Е.Д. Крутская**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы*.*** Оспа овец– остро протекающая контагиозная болезнь мелкого рогатого скота, характеризуется лихорадкой, папулезно-пустулезным поражением кожного покрова и слизистых оболочек, высокой смертностью животных, особенно молодняка. В случаях генерализованного и осложненного течения гибель овец достигает более 50% от числа заболевших. У больных животных вирус локализируется, в основном, в оспинах, расположенных на кожном покрове. Вирус оспы овец отличается высокой консервативностью и не имеет антигенных вариантов [63.65].

Данные Международного Эпизоотического Бюро свидетельствуют об осложнении в последние годы в некоторых регионах мира эпизоотической ситуации по ряду особо опасных инфекционных болезней мелких жвачных животных [OIE 2010-2011]. Среди болезней вирусной этиологии в первую очередь к ним относится оспа овец, характеризующаяся высоким уровнем заболеваемости и летальности. Оспа наносит овцеводству огромный экономический ущерб [64].

Оспа овец является наиболее экономически значимой в Кыргызской Республике и в странах Средней Азии, за последние 10 лет регистрировалась в 73 странах мира [49].

В Кыргызской Республике наблюдается достаточно напряженная эпизоотическая ситуация по оспе овец. Причинами роста заболеваемости является увеличение больного поголовья овец, находящегося в частных фермерских хозяйствах, а также недостаточный эпизоотологический мониторинг по оспе овец в регионах страны и отсутствие научно-обоснованной программы по борьбе с этой инфекцией [21].

Не менее существенными причинами неблагополучия по оспе овец в Кыргызской Республике являются контакты больных животных со здоровыми в пастбищный период слабый контроль за перемещениями и перевозками овец, отсутствие плановой специфической профилактики оспы овец. Вспышки оспы овец возникаюттакже вследствие торговли инфицированными животными, завезенными из неблагополучных областей. Зачастую продажа животных производится без согласования с государственной ветеринарной службой, без проведенной вакцинации, как было многократно установлено в ходе проведенных анамнестических обследований. Массовому распространению заболевания на территории республики способствует запоздалая диагностика заболевания, слабые знания владельцев животных клинических признаков болезни, отсутствие информации о неблагополучных пунктах и контроля за перегоном отар, недостаточное проведение ветеринарно-санитарных мероприятий.

В связи с этим совершенствование диагностики оспы с применением молекулярно-биологических методов на основе полимеразной цепной реакции для своевременного купирования и ликвидации оспы овец является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

**Связь темы диссертации с основными научно-исследовательскими работами.** Научно - исследовательская работа по данной проблеме выполнялась в соответствие с тематическим планом НИР лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева «Мониторинг оспы овец и интеграция современных методов диагностики с применением серологических и молекулярно-биологических методов» 2010 – 2014 гг, номер госрегистрации – 0005818,

***Цели и задачи исследований.*** Основной целью исследований явилась разработка и усовершенствование молекулярно-биологических методов диагностики оспы овец.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- проведение эпизоотологического анализа по оспе овец на територии Кыргызской Республики;

- анализ вспышек оспы овец на территории республики с применением спутниково-навигационных систем GPS с использованием компьютерных программ анализа QGIS и GeoDa ArcGIS.

- оптимизация условий подготовки проб для проведения ПЦР при индикации вируса оспы овец в различных биоматериалах (цельная кровь, пустулезная жидкость, пораженные участки кожи, суспензия органов и др.);

- оптимизация условий постановки ПЦР (температурный и экспозиционный режим, концентрация фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, количество праймеров, концентрация ионов магния и других солей);

- на основании сравнительного анализа известных нуклеотидных последовательностей провести подборку систем праймеров к различным областям генома вируса оспы овец для проведения ПЦР;

- оптимизация ПЦР для выявления вируса оспы овец в биологическом материале (пустулезная жидкость, пораженные участки кожи, суспензия паренхиматозных органов; конъюнктивальная жидкость, смывы ротовой и носовой полости и др.).

***Научная новизна работы.***

Впервые проведен анализ вспышек оспы овец с применением спутниково-навигационных систем GPS с использованием компьютерных программ анализа QGIS и ARGIS;GeoDa.

На основание сравнительного анализа известных нуклеотидных последовательностей подобраны системы праймеров и разработана простая и эффективная методика ПЦР праймеров для обнаружения вирусспецифического фрагмента ДНК генома оспы в различном биоматериале (смывы ротовой, носовой и конъюнктивальный, пустулезная жидкость, пораженные участки кожи, суспензия органов, кровь) и оптимизированы условия подготовки проб и проведения реакции.

***Практическая значимость полученных результатов***:

Разработана методика подготовки проб для проведения ПЦР при индикации вируса оспы овец в различном биологическом материале: образцах пустулезной жидкости, смывах ротовой полости, конъюнктивы и носа, пораженных участков кожи, суспензии органов.

Отработаны условия постановки ПЦР (время инкубации и температура, концентрация фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, количество праймеров, концентрация ионов магния). Усовершенствованный метод может использоваться в лабораторной диагностике оспы овец.

Разработана простая и эффективная методика ПЦР праймеров для обнаружения вирусспецифического фрагмента ДНК генома оспы в различном биоматериале, которая может использоваться в научно-исследовательских лабораториях для своевременной постановки диагноза.

***Экономическая значимость полученных результатов.*** Оптимизированый метод ПЦР легко применяется в лабораторной диагностике оспы овец. Внедрение в ветеринарную практику рекомендуемого метода диагностики оспы овец позволит быстро определить и диагностировать болезнь, значительно сократить заболеваемость и падеж мелкого рогатого скота от этой инфекции. При этом сократится расход средств на проведение организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий.

***Основные положения диссертации , выносимые на защиту:***

- проведен анализ вспышек оспы овец с применением спутниково-навигационных систем GPS, с использованием компьютерных программ анализа QGIS и ARGIS;GeoDa

- оптимизация условий подготовки проб для проведения ПЦР при индикации ДНК вируса оспы в различных биологических материалах;

- подбор праймеров и методика выявления вируса оспы с помощью ПЦР;

- оптимизация условий постановки ПЦР (температурный и экспозиционный режим, концентрация фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, количество праймеров, концентрация ионов магния и других солей);

***Личный вклад соискателя.*** Диссертантом самостоятельно проведен сбор первичного материала эпизоотической ситуации в Кыргызской Республике по оспе овец. С помощью геоинформационных систем и компьютерных программ QGIS ArcGIS GeoDa составлена карта очагов оспенной инфекции, самостоятельно проведена лабораторная диагностика оспы овец молекулярно-биологическим методом (ПЦР). Проведена оптимизация ПЦР и обработка экспериментальных материалов исследований, изложенных в таблицах и диаграммах. Оптимизация полимеразной цепной реакции при исследовании вируса оспы овец и разработка праймера выполнены с участием сотрудников лаборатории вирусологии и биотехнологии КыргНИИВ и закрытого акционерного общества (ЗАО) «Алтын-Тамыр» под научным руководством д.в.н., профессора, член-корреспондента НАН КР Нургазиева Р.З.

***Апробация материалов диссертации.*** Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им А. Дуйшеева, на научных конференциях Кыргызского национального аграрного университета им. К.И Скрябина, Казахского национального аграрного университета им. С.Сейфулина.

***Публикации по работе.*** По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 4 единоличных, одна рекомендация.

***Структура и объем диссертации.*** Диссертация изложена на 121 странице компьютерного текста, иллюстрирована 52 рисунками и 11 таблицами и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические предложения, список использованной литературы, включающий 182 источника, из которых 110 иностранных авторов, приложение, содержащее нормативно-техническую документацию.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** дано обоснование актуальности темы исследований,необходимости совершенствования методов анализа эпизоотической ситуации по оспе с помощью ГИС систем и методов ранней диагностики оспы овец с помощью полимеразной цепной реакции.

**В главе 1 «Обзор литературы»** по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается общая характеристика вируса оспы овец, применяемых методов диагностики, как серологические и молекулярно-биологические, их достоинства и недостатки.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»**дана характеристика объектов исследования и методических подходов к выполнению исследований.

В работе также использованы материалы государственной ветеринарной отчетности по заболеваемости овец оспой.

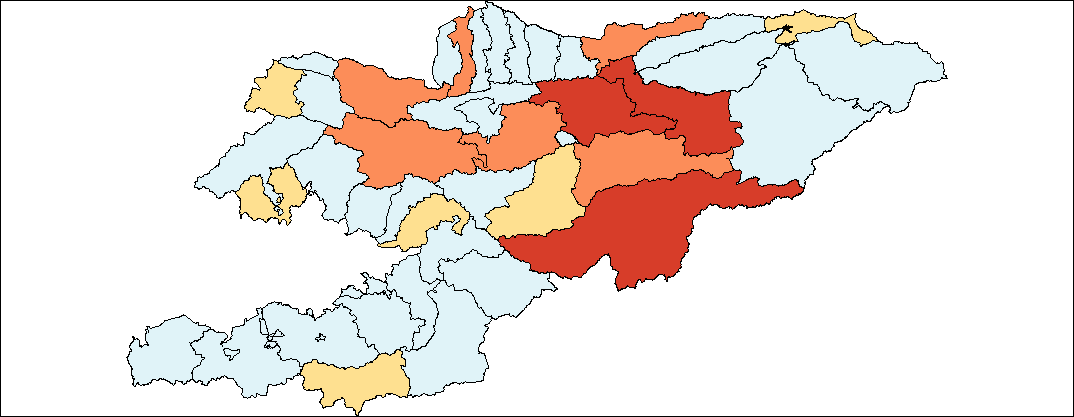
Для лабораторной диагностики оспы овец отбирали сыворотки крови, патологический материал и смывы от больных животных с целью установления эпизоотической природы болезни. Из патологического материала выделяли высокомолекулярную ДНК, пригодную для амплификации в ПЦР.

Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе ABI PRISM в объеме 20 мкл в растворе, содержащем воду, 5х буферный раствор для ПЦР; 15 мМ MgCl2; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; 0.2 ед. Taq-полимеразы в каждую пробирку; по 2 мкл каждого из праймеров с концентрацией 5 оптических единиц, 3 мкл исследуемой ДНК. Встряхивали пробирку на вортексе, все капли со стенок собирали центрифугированием в течение 5-10 секунд. При обобщении результатов экспериментов использовано общепринятые классические вирусологические и молекулярно биологические методики.

**результаты собственных исследований**

**3.1 Распространение вируса оспы овец в Кыргызской Республике**

Изучая эпизоотическую ситуацию, особое внимание было уделено биологическим характеристикам течения оспы овец. Проведен анализ количества неблагополучных пунктов по оспе овец и их расположение на карте, число заболевших и павших животных. Данные использованы при анализе эпизоотической ситуации по оспе овец по ГИС технологии по программе GeoDa. С помощью данной программы были определены зоны с различными степенями риска заболевания.



*Регион с низским риском заболевания*

*Регион среднего риска заболевания*

*Регион с высоким риском заболевания*

Рис.1. Неблагополучные регионы по оспе овец

С помощью данной карты разрабатывалась стратегия по борьбе с оспой овец, возможное прогнозирование дальнейшего распространения инфекции и путей ее заноса. С помощью разработанной стратегии возможно купирование инфекции и предотвращение ее распространения.

По литературным данным [22.50] первые крупные вспышки оспы овец были зарегистрированы в 2002 году в хозяйствах Таласской области. Далее заболевание овец оспой наблюдали в соседних населенных пунктах, и в дальнейшем инфекция получила распространение в северном направлении. Возникновение очагов оспы в 2002 году в ряде районов Таласской области было связано с ухудшением эпизоотической обстановки по оспе в Средней Азии и в Кыргызской Республике в целом.

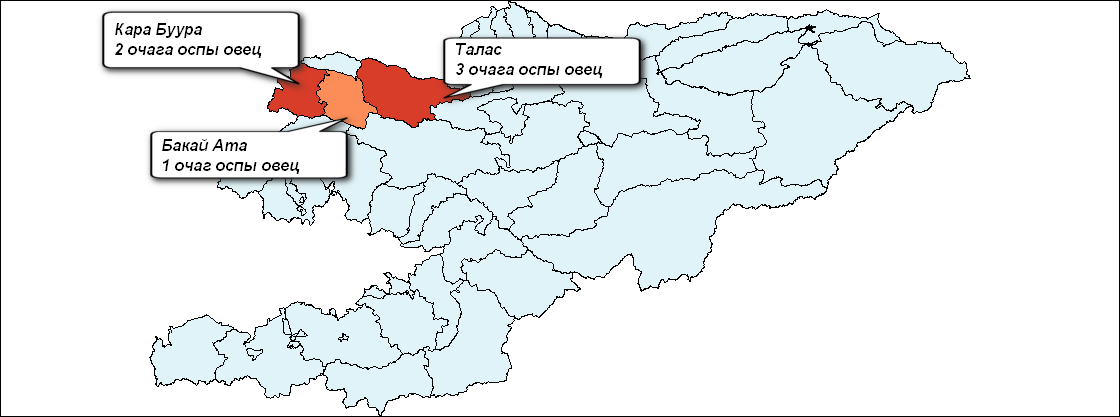


Рис.2. Первые очаги оспы овец в Талаской области

Появление очагов оспы овец в Жумгальском районе Нарынской области в 2007 г связано с появлением первых очагов заболевания среди животных на пастбищах Суусамырской долины при контакте с переболевшими овцами из хозяйств Таласской области. Далее в 2008 г. очаги оспы овец регистрировали в Кочкорском районе, затем согласно магистрали дорог в Нарынском и Ат-Башинском районе, где в последние два года увеличивалось число вспышек оспы овец.

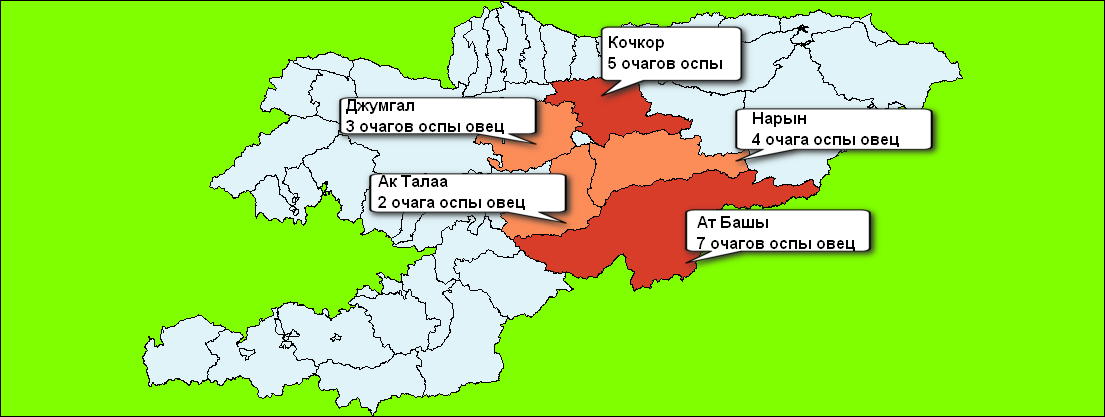


Рис.3. Очаги оспы овец в Нарынской области

На начало 2010 года очаги оспы регистрировались в Атбашинском районе Нарынской области и Тонском районе Иссыкульской области.

В 2012 году оспа овец зарегистрирована в Сузакском районе Джалал- Абадской области, точнее в селе Барпы. Здесь два неблагополучные хозяйства были зафиксированы GPS навигатором проведено дальнейшее изучение по ГИС технологии и слежения эпизоотической ситуации в регионе.

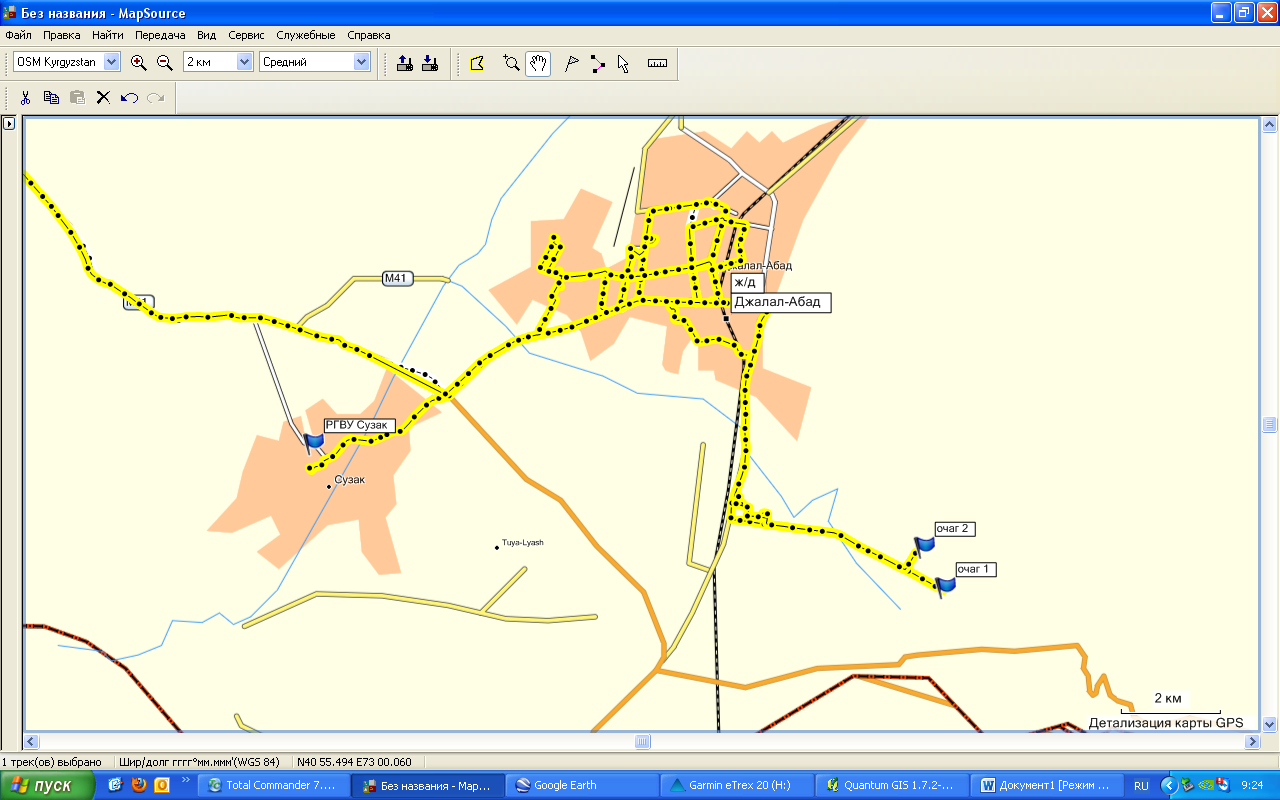


Рис.4. Зафиксированные очаги вспышки оспы с помощью GPS навигатором в селе Барпы Сузакского района Джалал Абадской области

Во всех неблагополучных пунктах, где наблюдалась оспа, заболевание протекало остро, характеризовалось массовостью, кратковременным повышением температуры тела на 1-20С, вялостью и снижением аппетита. Часто эти клинические признаки сопровождались покраснением слизистых оболочек ротовой и носовой полости, гнойными выделениями из носа и глаз. Сначала появились розеолы, которые превращались в темно-красные, быстро некротизирующиеся папулы. Иногда папулы сливались и подсыхали, образуя корочки.



Рис.5. Оспенные папулы на бесшерстных участках кожи ягненка

**3.2 Выбор праймеров для проведения ПЦР**

С применением специальных компьютерных программ и используя информацию международных компьютерных банков данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), EMBL ([www.ebi.ac.uk/embl.html](http://www.ebi.ac.uk/embl.html)) нуклеотидной последовательности генома известных изолятов и штаммов вируса оспы овец, выбирали специфический фрагмент генома ДНК, пригодный для отжига праймеров. Длина олигонуклеотидных праймеров составляла 20-23 п.н. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием сетевой программы ClustalW BioEdit и GeneScript.

Таблица 1 - Разработанный новый праймер

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| KR-1 | GGTCGCGAAATTTCAGATGT | 20 | 6831 | 20 | 137 |
| KR-2 | TGAGCCATCCATTTTCCAAC | 20 | 7113 | 15 | 107 |

С целью предотвращения появления возможных неспецифических реакций была подобрана оптимальная концентрация праймеров. Количество праймеров в реакционной смеси варьировало от 0.1 до 0.3 мкл. Как видно из рис. 6 оптимальная концентрация праймеров – 0.2 мкл, обеспечивала максимальную чувствительность при минимальном расходе реактивов. В то же время снижение количества праймеров в 2 раза ухудшало чувствительность ПЦР.

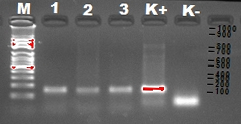


Рис.6. К+ положительный контроль ПЦР; К- отрицательный контроль ПЦР; 1 – концентрация праймеров 0.1мкл в реакционной смеси; 2 - концентрация праймеров 0.2 мкл в реакционной смеси; 3 - концентрация праймеров 0.3 мкл в реакционной смеси

**3.3 Оптимизация условий пробоподготовки для ПЦР**

Из патологического материала готовили 10% суспензию на растворе Хенкса, которую осветляли центрифугированием. Патологический материал сначала измельчали, затем в фарфоровой ступке растирали пестиком с добавлением стеклянного песка и физиологического раствора из расчета 1:10 (рН 7,2 - 7,4) до получения однородной массы. Полученную суспензию после двукратного промораживания при -20-400С центрифугировали при 1100 g в течение 30 минут. Надосадочную жидкость пропускали через фильтры «Миллипор» (США) диаметром пор 0,22 мкм. К фильтрату добавляли пенициллин (1000 ед./мл), стрептомицин (1000 мкг/мл), гентомицин (200 мкг/мл).

**3.4 Оптимизация условий постановки ПЦР**

С целью оптимизации условий постановки ПЦР проводили предварительные ПЦР реакции.

Таблица 2 - Расчет состава реакционной смеси для постановки ПЦР (в расчете на одну пробу)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Конц. | Сток | 100µl | **20µl** |
| Буфер | 1х | 5х | 10µl | 4µl |
| MgCl2 (25-mM) | 2.5mM | 25mM | 10µl | 2µl |
| dNTP’s(10-µM) | 0.2mM | 10mM | 2.0µl | 0.4µl |
| Primer#1 | по 0.1µM | 10µM | по 1µl | 0.2µl |
| Primer#2 | по 0.1µM | 10µM | по 1µl | 0.2µl |
| Polymerase | 0.05u/µl | 5u/µl | 1µl | 0.2µl |
| Матрица |  |  |  | 3µl |
| H2O |  | mQ | до 100µl | 12.4µl |

Пробы переносили в амплификатор и проводили амплификацию

Таблица 3 - Режим температуры, время отжига и число циклов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Режим | Температура | Время | Число циклов |
| Начальная денатурация | 950С | 5 минут | 1 цикл |
| Денатурация  Отжиг  Элонгация | 940С  550С  720С | 45 секунд  1 минута  1 минута | 35 циклов |
| Завершающая элонгация | 720С | 5 минут | 1цикл |

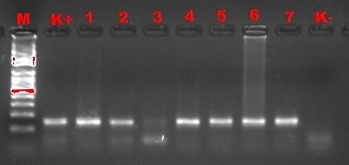
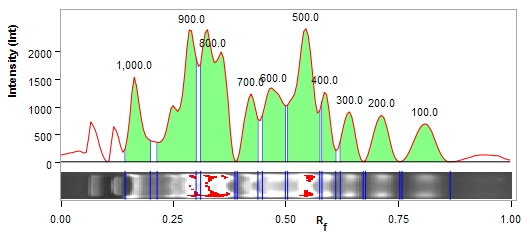
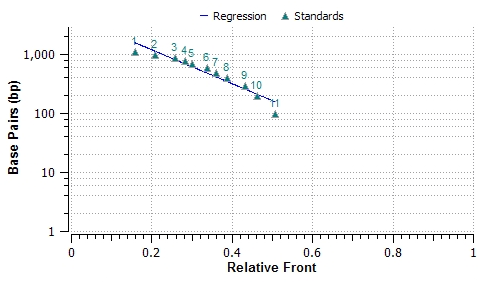


Рис.7. Электрофореграмма амплифицированной ДНК при оптимизации ПЦР вируса оспы овец.

Примечание: М - Маркер ДНК "AXYGEN. К+ положительный, 1- смыв носовой полости, 2 – смыв конъюнктивы, 3 – кровь, 4 - смыв ротовой полости, 5 – сухие корочки от больных животных, 6 - лимфатические узлы, 7– суспензия из легких, К- отрицательный контроль

При считывании результатов ПЦР нами взяты стандартные и кривые показатели маркера и молекулярный вес амплифицированой ДНК.

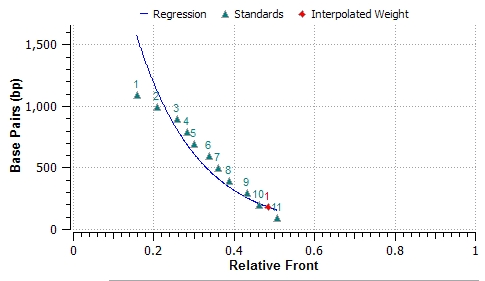
Рис.8. Стандартныймаркер ДНК "AXYGEN Bioscience 100-1000 п.н." при обнаружение вируса оспы овец

Рис.9. Стандартный маркер ДНК "AXYGEN Bioscience от 1000 до 100 п.н. при предварительной ПЦР реакции

*Пар нуклеотиды*

*стандарт*

регрессия



*регрессия*

*молекулярный вес*

*стандарт*

*Пар нуклеотиды*

Рису.10. Кривая молекулярного веса в области 165 п.н амплицированной ДНК вируса оспы овец

Наличие фрагмента расчетной длины 165 п.н свидетельствовало о присутствии ДНК вируса оспы овец в исследуемой пробе.

**3.5 Отработка оптимальных методов выделения вируса оспы овец**

Вирусы являются не только потенциально патогенные, но и играют существенную роль в молекулярной биологии. Выделение ДНК вируса оспы овец с высокой степенью чистоты и целостности часто является проблемой. Нами при подготовке ПЦР было испытано несколько способов выделения ДНК из патологического материала с помощью Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit. “AXYGEN” и набора для универсальной пробоподготовки «Набор для выделения ДНК из биопроб» “LITEX” Москва, Россия.

**3.6 Получение очищенных ДНК ВОО из выделенных ДНК ВОО**

С целью получения очищенного ДНК от белков вируса оспы овец использовали коммерческий набор AxyPrep. Для очистки применяли специальные связующие растворы в сочетании со специальной мембраной хроматографической, имеющей оптимизированную структуру для достижения высокой селективности и восстановления линейных фрагментов ДНК. Этот продукт предназначен для очистки фрагментов ДНК больше чем на 75 пар нуклеотидов из ПЦР продуктов и других ферментативных реакций, с ожидаемым восстановлением от 70% до 90%.

Рис.11. Концентрация ДНК после очистки ДНК вируса оспы из смывов ротовой, носовой полости и конъюнктивы коммерческим набором AXYGEN

Накопление вирусной ДНК было достаточным в смывах носовой и ротовой полости и конъюнктивы.

Рис.12. Концентрация ДНК после очистки ДНК вируса оспы из проб легких, пищеварительных органов и лимфатических узлов коммерческим набором AXYGEN

При исследовании сывороток крови и цельной крови в инкубационный период оспы овец больные овцы были первоначально тестированы с использованием ПЦР для выявления вирусоспецифического фрагмента ДНК. Затем проведена очистка вируса для определения концентрации вирусного ДНК.

Рис.13. Концентрация ДНК после очистки ДНК вируса оспы в пробах крови, сыворотки и жидкости папулы коммерческим набором AXYGEN

**3.7 Использование метода ПЦР при выявлении вируса оспы овец в различных биоматериалах**

В Нарынском районе в 2011 году в селе Чет-Нура была зарегистрирована вспышка оспы овец. При проверке трех фермерских хозяйств установлено, что причиной вспышки заболевания явилась покупка больных оспой овец (в инкубационном периоде) из неблагополучных районов Нарынской области как Ат–башинского и Акталинского районов. Общее количество заболевших животных достигало 44 голов, из которых больше половины погибли.

Для лабораторной диагностики использовали ПЦР. Были исследованы образцы носовых и конъюнктивальных смывов, суспензий из легких, лимфатических узлов и пищеварительных органов.

Таблица 4 -Результаты исследования патологических материалов с применением ПЦР

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Дни | Кожный покров | Истечение из носа | Cлюна | Коньюн\й смыв | Лимфа | Легкие | Пищеварительные органы | Печень | Почки |
| 4 | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 6 | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 16 | + | + | + | - | + | - | + | - | - |
| 18 | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 20 | + | - | - | - | - | - | + | - | - |

При постановке ПЦР из проб конъюнктивальных и носовых смывов от овец, у которых не наблюдались явные клинические признаки, найдены фрагменты вирусной ДНК оспы овец. Полученные результаты свидетельствуют о наличии тропизма вируса для определенных органов, где могла наблюдаться ранняя инфекция оспы овец, которая через несколько дней может привести к образованию и развитию клинической картины болезни.

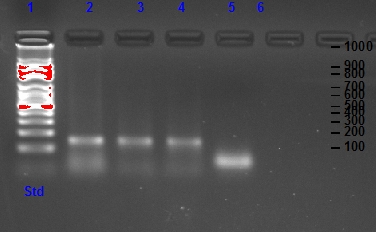


Рис.14. Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец с помощью ПЦР в образцах из ротовых, носовых и конъюнктивальных смывов, отобранных в Нарынской области во время вспышки оспы овец.

**3.8 Изучение и обработка температурно-временного режима при постановке ПЦР**

В целях оптимизации выхода продукта ПЦР в условиях неопределенности температуры отжига праймеров использовали процедуру «скатывания», когда температура отжига уменьшается постепенно, цикл за циклом. Суммарная ее разница составляет 15-20oC. С этой целью использовали термоциклер с градиентными температурными платами, позволяющими проводить подбор температуры отжига праймеров.

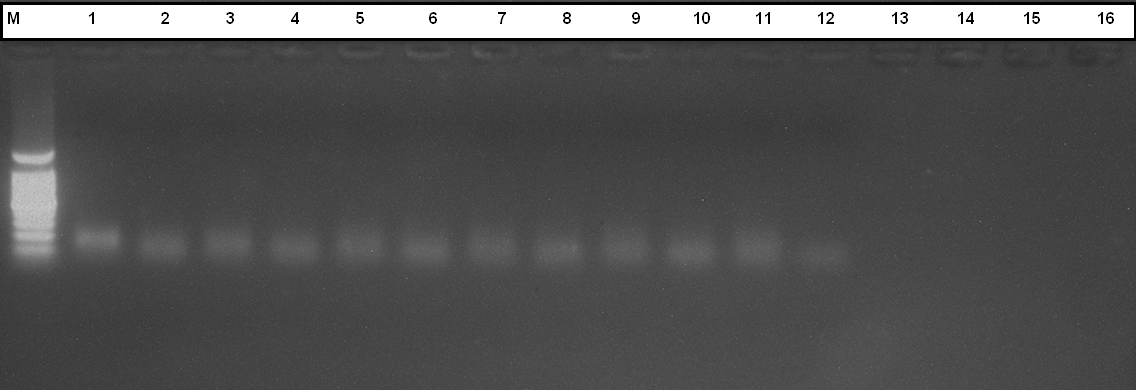


Рис.15. Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец при различной температуре отжига праймеров

**Примечание** - М – Маркер ДНК "AXYGEN Bioscience 100-1000 bp", 1-45,3, 2-45,4оС, 3-46,6оС, 4-47,6оС, 5-49,3оС, 6-51,2оС, 7-52,5оС, 8-54,2оС, 9-55,0оС, 10-58,2оС, 11-59,3оС, 12-61,6оС,13- отрицательный контроль

**3.9 Подбор оптимальных условий проведения ПЦР**

Результаты постановки полимеразной цепной реакции находится в большой зависимости от параметров, входящих в состав буфера, как концентрация *MgCl2 и KCl, рН* буфера. Изменения в буфере для ПЦР вызывают качественное или количественное изменение выхода ампликонов. В ходе работы нами апробированы 5 буферных систем, которые различались концентрацией рН. Состав буферных систем приведен в таблице.

Таблица 5 - Состав буферных систем, использованных при оптимизации ПЦР

|  |  |
| --- | --- |
| № буфера | Состав ПЦР буфера, х5 |
| 1 | 100 мМ Tris HCl, pH 8,3, 15 мМMgCl2, 250 мМKCl |
| 2 | 100 мМ Tris HCl, pH 8,3, 15 мМMgCl2, 750 мМKCl |
| 3 | 100 мМ Tris HCl, pH 8,6, 15 мМMgCl2, 250 мМKCl |
| 4 | 100 мМ Tris HCl, pH 8,6, 15 мМMgCl2, 750 мМKCl |
| 5 | 100 мМ Tris HCl, pH 8,8, 15 мМMgCl2, 250 мМKCl |

В таблице приведено варианты состава буфера которые были испытаны в эксперименте все варианты соответствовали условиям эксперимента.

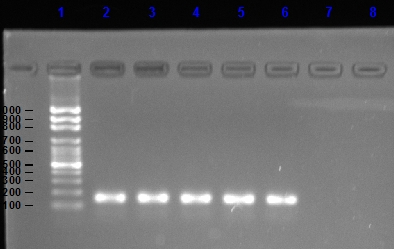


Рис.16. Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец при использовании буферных системв реакционной смеси.

Из электрофореграммы следует, что при использовании разных буферных систем происходит амплификация фрагмента и нарабатывается ПЦР-продукт размером 165 п.н, представленный на рисунке яркими и четкими полосами. Существенных различий при использовании разных буферных систем (№, 1, 2, 3, 4, 5 ) не наблюдается.

Варьирование концентраций *MgCl*приводить к снижению выхода неспецифического продукта и увеличению выхода амплификата. Обычно оптимальные концентрации перечисленных выше соединений подбираются эмпирическим путем, в процессе оптимизации условий реакции.

В ходе работы были апробированы системы, которые различались концентрацией магния хлора.

Таблица 6 - Концентрация ионов *MgCl* при оптимизации ПЦР

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Реактивы | Количество \ед мМ | Конечная концентрация ионов MgCl | | | | | |
| 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 | 4.0 | 6.0 |
| Стерильная вода | - | 10.6мкл | 10.4мкл | 9.7мкл | 8.6 мкл | 8.1мкл | 7.6мкл |
| Реакционный буфер, х5 | 1 | 4мкл | 4мкл | 4мкл | 4мкл | 4мкл | 4 мкл |
| Смесь dNTPх10 | 0.2 | 0.4 мкл | 0.4мкл | 0.4мкл | 0.4мкл | 0.4мкл | 0.4мкл |
| Праймер F 5 | 0.5 | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл |
| Праймер R5 | 0.5 | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл | 2мкл |
| ДНК |  | 3 мкл | 3мкл | 3мкл | 3мкл | 3мкл | 3мкл |
| MgCl | 1 | 0,8мкл | 1мкл | 1.5мкл | 2мкл | 2.5мкл | 3мкл |
| Полимераза |  | 0.2 мкл | 0.2 мкл | 0.2мкл | 0.2мкл | 0.2 мкл | 0.2 мкл |

Количество ионов *MgCl* варьировало от 1.5 мM до 6 мM В качестве матрицы использовали выделенную ДНК. При увеличении концентрации *MgCl*, как правило, происходило увеличение концентрации специфического продукта реакции. Оптимальной концентрацией *MgCl* для тестируемых праймеров, которая обеспечивала высокий выход специфического продукта реакции без дополнительных неспецифических фрагментов, выбрана концентрация 3мкл

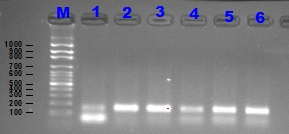


Рис.17.Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец в режиме 60 вольт на 30 минут при оптимизация концентрации *MgCl*  .

При этом используется слишком маленькое количество Taq-полимеразы, выход продукта снижается. Это снижение тем серьезнее, чем больше размер продукта. Не следует использовать и слишком большой избыток Taq-полимеразы. При этом появляются высоко- и низкомолекулярные шмеры.

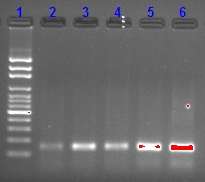


Рис.18. Электрофореграмма амплифицированной ДНК полимеразы при оптимизации концентрации ДНК-полимеразы в реакционной смеси при обнаружении ДНК вируса оспы овец методом ПЦР в режиме 120 вольт на 5 минут.

**Примечание** - 1 – М – маркер ДНК "AXYGEN Bioscience 100-1000 bp", 2 – 0,5 ед; 3 – 1,0 ед; 4 – 1,5 ед; 5 – 2,0 ед; 6 – 2,5

Как видно из рисунка 18, концентрация Taq ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта; замечено, что с повышением концентрации фермента в реакционной смеси происходит увеличение интенсивности полос, следовательно, и концентрации ДНК. Однако при активности фермента всего 1,0 ед. (полоса № 3) нарабатывается ПЦР-продукт, который достаточно легко визуализировать в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия под УФ-светом.

**3.10 Определение чувствительности ПЦР при идентификации вируса оспы овец**

Дальнейшие исследования проводили по определению чувствительности разработанного метода ПЦР при идентификации вируса оспы овец. Чувствительность метода определяли восьмикратным разведениями ДНК. Полученные пробы анализировали в 2 % агарозном геле, приготовленном на ТВЕ буфере

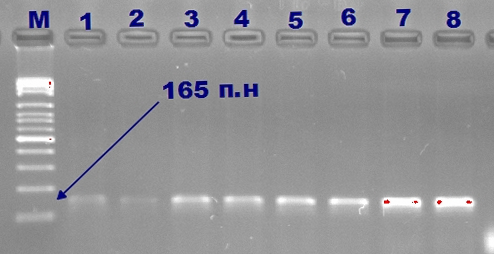
****

Рис.19. Определение чувствительности ПЦР при идентификации вируса оспы овец

**Примечание** - М – маркер ДНК "AXYGEN Bioscience 100-1000 bp", 1 –10

2 –0,1 пг 3 –1 пг; 4 –10 пг; 5 –; 0,1 нг 6 –1 нг; 7 –; 10 нг; 8 – 100 нг;

Как видно из данных рисунка, чувствительность разработанного метода ПЦР при выявлении ДНК вируса оспы овец составляет 0,1 нг.

Таким образом, в результате отработки и оптмизации параметров постановки ПЦР для идентификации вируса оспы овец оптимальным оказалось использование специфических праймеров, позволяющих нарабатывать ПЦР продукт размером 165 п.н., характерный только для вирусов оспы овец.

Клиническая чувствительность ПЦР, была определена с использованием ограниченного числа естественно зараженных животных. Для подтверждения этого теста потребуется большее количество инфицированных и неинфицированных животных, в идеале в естественной обстановке. При определении порога чувствительности ПЦР использовали программы амплификации.

Результаты проведенных экспериментов показали, что разработанный метод ПЦР позволяет обнаруживать ДНК вируса оспы овец в разных клинических образцах.

Дальнейшие исследования проводили по определению специфичности отработанного метода ПЦР при идентификации вируса оспы овец.

В качестве исследуемых проб использовали ДНК вирусов. Полученные результаты исследований представлены на рис 20.

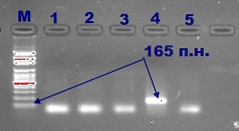
****

Рис.20. Электрофореграмма определения специфичности ПЦР при идентификации вируса оспы овец

Примечание - М - маркер ДНК "AXYGEN 1 – аденовирус . 2 - оспа птиц К.3 – парвовирус собак. 4- оспа овец SP. 5 – герпес вирус лошадей

В результате проведенных исследований положительный результат получили в пробе № 4 фрагмент ДНК вируса оспы овец (165 п. н.). В остальных пробах, которые использовались в качестве отрицательного контроля получили ожидаемые результаты.

**ВЫВОДЫ**

1 Установлено, что уровень заболеваемости овец оспой и число очагов инфекции не сокращается; ежегодно регистрируются новые очаги оспы в разных регионах республики. Так, в 2012 году зафиксировано 10 новых очагов оспы овец, в основном в Джал-Абадской и в Нарынской областях.

2. Для эпизоотологического мониторинга по оспе овец освоена и применена спутниково-навигационная система GPS с использованием компьютерных программ QGIS и GeoDa Arc GIS: С применением GPS навигатора в 2012 году зафиксированы свежие очаги оспы в Джалал-Абадской и в Нарынской областях, разработаны карты прогнозирующие эпизоотическую ситуацию по оспе овец.

3. Оптимизированы условия подготовки проб для проведения ПЦР и индикации вируса оспы овец в различных биоматериалах (цельная кровь, пустулезная жидкость, пораженные участки кожи, суспензия органов и др.): оптимальной pH для суспензии является 7,2-7,4, температура двукратного промораживания вирусной суспензии -20-400С, дозы антибиотиков к фильтрату: пенициллин 1000 ед\мл, стрептомицин 1000 мкг\мл, гентомицин 200мкг\мл

4. На основании сравнительного анализа известных нуклеотидных последовательностей подобраны системы праймеров к различным областям генома вируса оспы овец. Длина олигонуклеотидов 20-23 п.н, выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием сетевой программы ClustalW, Bio Editb GeneScript.

5. Оптимизированы условия постановки ПЦР (температурный и экспозиционный режим, концентрация фермента в реакционной смеси, количество ДНК матриц, праймеров, концентрация ионов магния и других солей. В стадии начальной денатурации оптимальным является t 950С, время цикла 5 минут, число циклов 1; в стадии денатурации соответственно 940С, 45 секунд, температура отжига 550С 1 минута. Элонгация 720С, 1 минута, общий 35циклов.в стадии завершающей элонгации 720С, 5 минут , 1 цикл.

6. Усовершенствованная методика постановки полимеразной цепной реакции благодаря ее более высокой чувствительности позволяет достаточно точно и своевременно диагностировать оспенную инфекцию и оперативно организовать меры ее ликвидации.

**ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Для практического использования в лабораторной диагностике оспы овец и ее профилактике предлагается:

- эпизоотологический мониторинг оспы овец с применением спутниково-навигационных систем GPS с использованием компьютерных программ анализа QGIS и ARGIS;GeoDa;

- система праймеров для обнаружения вирусспецифического фрагмента ДНК генома оспы в биоматериале;

- предложена простая и эффективная методика постановки ПЦР для обнаружения ДНК вируса оспы овец.

Внедрение в ветеринарную практику рекомендуемого метода диагностики оспы овец позволит быстро диагностировать болезнь, значительно сократить заболеваемость и падеж мелкого рогатого скота от оспенной инфекции.

По результатам исследовательской работы подготовлены и изданы рекомендации и методические указания для практического использования в оздоровлении хозяйств от оспенной инфекции.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Орозов Ж.Ч. Вопросы диагностики и профилактики оспы овец и коз [Текст] / Р.З Нургазиев., Н.Т Джапаралиев., Ж.Ч Орозов.// Вестник сельскохозяйственной науки –Бишкек, 2009.-№1.-С. 148-151.
2. Орозов. Ж.Ч. Эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике [Текст] / Р.З Нургазиев., Ж.Ч Орозов., А.Т Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А. Дуйшеева – Бишкек, 2009.- № 1.-С.152-154.
3. Орозов Ж.Ч. Сопоставление результатов серологических исследований и показателей защищенности вакцинированных овец[Текст] / Ж.Ч Орозов // Вестник КНАУ – Бишкек, 2009.-№4.-С. 43-45
4. Орозов Ж.Ч. Испытание сэндвич – варианта ИФА для выявления вируса оспы овец.[Текст] / Ж.Ч Орозов., Т.Т Кожоналиев., К.К Мусуралиев., Р.З Нургазиев., Н.Т Джапаралиев // Вестник сельскохозяйственной науки – Бишкек, 2010.-№2.-С. 84-86
5. Орозов Ж.Ч. Патогенность выделенного изолята вируса оспы овец в оспенных очагах Кочкорского района [Текст] / Ж.Ч Орозов. // Вестник сельскохозяйственной науки – Бишкек, 2010.-№2.-С. 74-76
6. Орозов Ж.Ч. Подготовка вирусного материала для диагностики оспы овец [Текст] / Ж.Ч Орозов // Вестник сельскохозяйственной науки – Бишкек, 2011.-№4.-С 187-190
7. Орозов Ж.Ч. Выделение ДНК вируса оспы овец разными реагентами [Текст] / Ж.Ч Орозов // Международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными экзотическими и зооантропонозными болезнями животных» Алматы, 2012. – 1 Том. – С 123-126

Орозов Жайлообек Чоконовичтин **«Кул ылаңын аныктоодо полимердик чынжыр реакциясын оздоштуруу** темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын

**РЕЗЮМЕСИ**

**Негизги сөздөр:** Кул, байкоо жургузуу, очок,

**Изилдөөнүн объектиси:** очок чыккан жер, ылаңдаган малдар, патологиялык материалдар, малдардын канынын сары суусу, ички органдары, ооруган малдын чылпагы жана оозу мурдунан алынган суртундулор.

**Иштин максаты:** Кыргыз Республикасынын территориясында чыккан кул ыланын аныктоодо спутниктерди колдонуп аны карта бетине тушуруу жана кул ыланын аныктоодо полимердик чынжыр реакциясын оздоштуруу

Полимердик чынжыр реакциясын коюнун астында ага керектуу болгон материалдарды оптималдаштыруу (кан, кандын сары суусу, исиркек суусу, жара карттары, органдардын алынган суюктуктар).

Полимердик чынжыр реакциясын коюда (температуралык режимди оптималдаштыруу, ферментердин концентрациясын оптималдаштыруу, ДНК жана праймерлердин коломун аныктоо ж.о.э башка туздарды карап чыгуу)

**Изилдөөнүн ыкмалары:** молекулярдык-биологиялык эпизоотологиялык мониторинг, вирусологиялык, спутниктердин жардамы менен Кул очокторун карта бетине тушуруу.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы:** Кыргыз Республикасында биринчи жолу кул ыланын очокторун спутник аркылуу карта бетине тушуруу. Алынган материалдардын натыйжасында кул ыланын аныктоодо жана алдын ала чара кору убагында колдонууга жардам берет.Кул ыланын Полимердик чынжыр реакциясын оздоштуруу жана оркундотуу ошондой эле кул ыланын бат аныктоодо жана шартка жараша ыкчам чараларды корууго жардам берет.

**Колдонуу чөйрөсү:** эпизоотологиялык, вирусологиялык жана ветеринардык практика. Лаборатордук шартта жана илимий изилдоо учурунда.

**РЕЗЮМЕ**

диссертации Орозова Жайлообека Чоконовича на тему **«Оптимизация полимеразной цепной реакции при диагностике оспы овец»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Ключевые слова:** картирование, мониторинг, патологический материал, диагностика, вирус оспы

**Объект исследования:** очаги вспышки оспы, восприимчивые животные, патологический материал, сыворотка крови животных. Смывы ротовой, носовой и конъюнктивальный от больных животных

**Цель работы:** Анализ эпизоотической ситуации по оспе овец с применением спутниково-навигационных систем GPS, с использованием компьютерных программ анализа QGIS и GeoDa.

Оптимизация условий подготовки проб для проведения ПЦР при индикации вируса оспы овец в различных биоматериалах (цельная кровь, пустулезная жидкость, пораженные участки кожи, суспензия органов и др.);

Оптимизация условий постановки ПЦР (температурный и экспозиционный режим, концентрация фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, количество праймеров, концентрация ионов магния и других солей); для диагностики оспы овец.

**Методы исследования:** эпизоотологический мониторинг, молекулярно-биологический, вирусологический

**Полученные результаты и их новизна:**. оптимизированы условия подготовки проб для проведения ПЦР при индикации ДНК вируса оспы в различных биологических материалах;. Применение усовершенствованный ПЦР в лабораторной диагностике оспы овец позволяет быстро и точно диагностировать оспу в ранней стадии болезни.

**Область применения:** эпизоотология, вирусология и ветеринарная практика.

**RESUME**

Orozov Jailobek Chokonovich

dissertation on a theme **«Optimization Polymerase chain reaction in diagnosing sheep pox »** on competition of a scientific degree of the candidate of biology sciences on a speciality 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootology, micology with micotoxicology and immunology

**Keywords:** sheep pox, monitoring,

**Object of research:** susceptible animals, pathological material, whey of serum of animals, strain of sheep pox virus,

**The work purpose:** study the epidemiological situation where outbreaks sheep pox virus with GIS system with program QGIS Arc GIS and GeoDa

Optimization of the preparation for PCR with indication of sheep pox virus in various biomaterials (whole blood, pustular liquid, the affected skin, organs and suspension, etc.);

Optimization of PCR (temperature and exposure mode, the concentration of enzyme in the reaction mixture, the amount of DNA template, the amount of primers, the concentration of magnesium ions and other salts);

**Research methods:** epizootological monitoring with GIS, molecular-biological investigation, virological

**The received results and their novelty:** For the first time in the Kyrgyz Republic studied epidemiological situation with GIS system. Optimized Polymer chain reaction in diagnosing sheep pox virus

**Scope:** epizootology, virology and veterinary practice.