

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. К.И. СКРЯБИНА**

Диссертационный совет Д 06.16.538

На правах рукописи
УДК 619:614.47+636.1.189

Нурабаев Сергазы Шуратбаевич

**«РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ЛОШАДЕЙ»**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Бишкек – 2017

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности» КН МОН Республики Казахстан

Научный руководитель: доктор биологических наук
Кошеметов Жумагали Каукарбаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Доолоткельдиева Тинатин Доолоткельдиевна

кандидат ветеринарных наук
Майхин Кыдырбай Тажибаевич

Ведущая организация: Институт биотехнологии, Национальная
Академия Наук Кыргызской Республики

Защита диссертации состоится «01» декабря 2017 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 06.16.538 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68. Кнау-info@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета (720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68).

Автореферат разослан «28» октября 2017г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук
доцент



Крутская Е.Д.

Актуальность темы диссертации. Грипп лошадей - остро протекающая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся кратковременной непостоянной лихорадкой, катаральным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, сухим и болезненным кашлем.

Анализ данных по распространению заболевания в мире за последние 30 лет свидетельствует о том, что неблагополучными по данной болезни являются около 50% стран европейского, азиатского и американского континентов.

В настоящее время во всем мире наибольшее беспокойство вызывает патогенный вирус гриппа лошадей (ВГЛ) с антигенной формулой H3N8, относящийся к семейству Orthomyxoviridae, типу А.

Грипп лошадей вызывают два подтипа возбудителя: А/лошадь 2/(H3N8), чаще всего поражающий лошадей, и А/лошадь 1/(H7N7), который в настоящее время полностью элиминировал в популяции лошадей, либо эта инфекция протекает субклинически.

Потенциальная эпидемиологическая опасность ВГЛ вызвана также и тем, что данное заболевание наряду с гриппом птиц может являться источником появления пандемического штамма гриппа человека, так как этот возбудитель от человека к лошади и наоборот может передаваться без посредников. Высокий мутационный потенциал, ежедневные тесные контакты человека с лошадью являются условием для совместного смешивания нескольких штаммов вируса гриппа, обмена генетической информацией и возможного появления пандемического гриппа для человека.

В общем комплексе мероприятий по предупреждению заноса и ликвидации особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных существенная роль принадлежит лабораторной диагностике и идентификации возбудителей заболевания.

В настоящее время в лабораторной диагностике и идентификации ВГЛ в странах дальнего зарубежья используются как классические, так и новые методы: выделение вируса на куриных эмбрионах, РТГА, ИФА, ПЦР.

Все они имеют различную диагностическую ценность. Одни требуют значительных затрат по времени, другие имеют низкую чувствительность и специфичность. Поэтому усовершенствование и разработка более чувствительных и специфичных, а также экспрессных методов лабораторной диагностики остается актуальной проблемой и до настоящего времени.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями.

Диссертационная работа входила в состав следующего проекта, разработанного РГП НИИ проблем биологических безопасности» КН МОН РК:

«Разработка современных средств и методов диагностики гриппа лошадей» 2010-2012 гг. № госрегистрации 0110РК00274

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является разработка диагностических тест-систем (ИФА, ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ) для идентификации и типирования ВГЛ с различной антигенной формулой в любых биологических образцах.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить культуральные свойства ВГЛ в перевиваемых линиях клеток и 11- суточных РКЭ;
- очистить и концентрировать ВГЛ, выделить NP и М белки, получить к ним антисыворотку, приготовить специфический антиген ВГЛ для ИФА и выделить специфический иммуноглобулин и приготовить иммунопероксидазный конъюгат из вирусосодержащей аллантоисной жидкости РКЭ;
- отработать оптимальные параметры постановки прямого варианта ИФА для обнаружения специфического антигена А ВГЛ;
- поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вируса гриппа лошадей, сконструировать и отобрать специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды, отработать параметры ОТ-ПЦР амплификации при субтипах Н7 и Н3 ВГЛ, определить специфичность и чувствительность ОТ-ПЦР при идентификации субтипов Н7 и Н3 ВГЛ;
- разработать ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ, определить специфичность и чувствительность ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ.

Научная новизна полученных результатов.

- Изучены культуральные свойства штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (Н7Н7) ВГЛ, штамм А/лошадь/Отар/764/07 (Н3Н8) ВГЛ в монослое перевиваемых линии клеток и 11- суточных РКЭ.
- Из вирусосодержащей суспензии выделен, очищен и сконцентрирован вирус гриппа лошадей.
- Из очищенных препаратов ВГЛ выделены NP и М белки и на их основе получены антисыворотки.
- Отработана методика приготовления антигена, выделения иммуноглобулинов и приготовления иммунопероксидазного конъюгата.
- Отработаны оптимальные условия постановки прямого варианта ИФА для обнаружения специфического антигена А ВГЛ.
- Проведены поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вируса гриппа лошадей, сконструированы и отобраны специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды.
- Подобраны параметры проведения ОТ-ПЦР амплификации при субтипах Н7 и Н3 ВГЛ.
- Подобраны параметры постановки ОТ-ПЦР-РВ при идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ.

- Определены специфичность и чувствительность ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ при идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ.

Практическая значимость полученных результатов. На завершённые разработки подготовлена следующая нормативно-техническая документация для лабораторной диагностики ВГЛ:

Тест-система [набор] для лабораторной диагностики и идентификации возбудителя гриппа лошадей методом иммуноферментного анализа, СТ 405-1919-04 ГП-044–2011.

Тест-система [набор] для выявления гена гемагглютинаина Н3 вируса гриппа лошадей методом полимеразной цепной реакции, СТ 405-1919-04 ГП-050–2011.

Тест-система [набор] для выявления гена гемагглютинаина Н7 вируса гриппа лошадей методом полимеразной цепной реакции, СТ 405-1919-04 ГП-051–2011.

Методические указания по лабораторной диагностике и идентификации гемагглютинаина Н7 вируса гриппа лошадей с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Методические указания по лабораторной диагностике и идентификации гемагглютинаина Н3 вируса гриппа лошадей с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Экономическая значимость полученных результатов.

Применение диагностических тест-систем на основе ИФА, ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ позволит с высокой точностью выявлять очаги эпизоотий ВГЛ на территории Республики Казахстан и принимать меры по их оздоровлению.

Разработанные тест-системы могут быть использованы в проведении мониторинговых работ по ВГЛ на территории Республики Казахстан.

Предлагаемые тест-системы по эффективности не уступают зарубежным аналогам, значительно дешевле, чем зарубежные тест-системы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- изучение культуральных свойств ВГЛ в перевиваемых линиях клеток и 11- суточных РКЭ;

- разработка ИФА, ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования ВГЛ;

- определение специфичности и чувствительности разработанных тест-систем для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ.

Личный вклад соискателя.

Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены на Международной конференции. Астана Биотех, 10-11 октября 2011 г.; на заседаниях Ученого Совета РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК.

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.

По теме диссертационной работы опубликовано 13 научных труда, в том числе 7 статей, 2 тезиса и получено 4 патента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 163 страницах компьютерного текста (Microsoft Word) и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 25 рисунками, 23 таблицами. Библиографический указатель включает 111 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приведены литературные данные, отражающие общее состояние заболеваемости гриппом лошадей и обоснована актуальность разработки тест-систем для диагностики вируса гриппа лошадей.

В главе 1 «Обзор литературы». По литературным источникам дана характеристика существующих мировых технологий производства тест-систем ИФА, ПЦР при диагностики ВГЛ.

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

В опытах использован следующий биологический материал: вирус гриппа лошадей, штаммы А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ. В опытах использованы козы местной породы в возрасте от 1 до 3 лет и кролики, перевиваемые линии культур клеток почки собаки (МДСК) и почки зеленой мартышки (Vero) и 11-суточные развивающиеся куриные эмбрионы.

Методы исследований

Культивирование вируса гриппа лошадей. Для получения вирусосодержащего материала использовали перевиваемые линии культур клеток почки собаки (МДСК) и почки зеленой мартышки (Vero) 10-11-сут РКЭ, которые инфицировали вирулентными штаммами ВГЛ.

Выделение иммуноглобулинов G (IgG) из специфических антисывороток проводили спиртовым осаждением по методу Кона.

Конъюгацию иммуноглобулинов G с пероксидазой хрена осуществляли по методу Уилсон и Накане.

Поиск и анализ нуклеотидных последовательностей ВГЛ, а также гена НА проводили на сайте NCBI – Influenza Virus Resource (Information, Search and Analysis).

Анализ и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью приложения пакета прикладных программ "FastPCR" и "BioEdit", приложения «AlignX» (алгоритм «ClustalW») пакета прикладных программ «Vector NTI Suite 9» («Informax inc.», США).

Подбор праймеров и олигонуклеотидных зондов. Специфические олигонуклеотидные праймеры и зонды, используемые для обнаружения ВГЛ

А/Н7N7 и А/Н3N8 с помощью ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ, подбирали с помощью программы «Primer Express 2.0» (фирма «Applied Biosystems», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Синтез олигонуклеотидов. Компьютерно-моделированные последовательности праймеров в дальнейшем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems. Синтез ДНК проводили согласно протоколам, прилагаемым к прибору.

Выделение вирусной РНК. Выделение РНК проводили с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit в соответствии с наставлением по применению данного набора.

Синтез кДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 20 мкл. Реакционная смесь содержит 10 пМ праймер R, 4 ед RNase inhibitor, 10 ед Reverse transcriptase и 5 мкл раствора суммарной РНК. Для синтеза кДНК проводили инкубацию при 42°C в течение 90 минут. После этого смесь прогревали при 85°C в течение 5 минут. По истечении времени пробы синтезированной кДНК использовали непосредственно в реакции ПЦР или помещали в холодильник при минус 20°C до использования.

Электрофорез в агарозном геле. Для электрофоретического анализа кДНК-амплификатов использовали 0,8 – 1,0% растворы агарозы в ТБЕ. Электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 60 V (3-5 вольт/см) на аппарате DNA – 100 ("Pharmacia"). Визуализацию полосы ДНК осуществляли с помощью бромистого этидия.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты исследований и их обсуждение» изучены культуральные свойства штаммов А/лошадь1 /Киргизия/74 (Н7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (Н3N8) ВГЛ.

В результате проведенных исследований отработаны следующие оптимальные параметры культивирования ВГЛ в РКЭ: возраст РКЭ 10-11 сут при заражении в аллантаисную полость; доза заражения 0,2 см³ с инфекционной активностью 10⁻³-10⁻⁴ lg ЭИД50 на эмбрион; температура инкубации РКЭ после заражения 32-35°C; относительная влажность 52±5 %; срок инкубирования инфицированных РКЭ 48 - 72 часа. При этом штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (Н7N7) ВГЛ по мере культивирования в РКЭ повышал свою биологическую и гемагглютинирующую активность с 24 по 48 ч от 5,16 ± 0,083 до 9,16 ± 0,083 lg ЭИД50/см³ и с 1:106,6 до 1:1365,3 соответственно. Штамм А/лошадь/Отар/764/07 (Н3N8) ВГЛ на протяжении 6 сут культивирования в РКЭ сохранил свою биологическую и гемагглютинирующую активности до 7,58±0,084 lg ЭИД50/см³ и 682,66 соответственно.

Также изучение культуральных свойств ВГЛ проводили в перевиваемых линиях клеток MDCK и Vero.

В результате проведения 3-х последовательных пассажей штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (Н7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (Н3N8) ВГЛ в

монослое перевиваемой линии клеток MDCK с добавлением в поддерживающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА отмечено, что наивысшая биологическая и гемагглютинирующая активность данных штаммов выявлена только в первом пассаже - $6,58 \pm 0,083$ lg ТЦД₅₀/см³ и $213,33 \pm 42,66$ соответственно для штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), $5,33 \pm 0,083$ lg ТЦД₅₀/см³ и $85,33 \pm 30,26$ для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7).

Результаты исследований, показывали, что мере пассирования штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемой линии клеток VERO с добавлением в поддерживающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА отмечено снижение биологической активности данных штаммов до второго пассажа с $4,83 \pm 0,083$ до $3,08 \pm 0,012$ lg ТЦД₅₀/см³ для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и с $5,33 \pm 0,083$ до $2,33 \pm 0,16$ lg ТЦД₅₀/см³ для штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8). Гемагглютинирующая активность данных штаммов снижается с 1:8-1:32 до 1:2-1:4.

Выделение, очистка и концентрирование ВГЛ из вирусосодержащей аллантоисной жидкости РКЭ

С целью приготовления активных и специфичных диагностических препаратов требовалось получить очищенные и концентрированные препараты данного вируса.

Исходя из этого нами проведены опыты по оптимизации методов очистки штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ из вирусосодержащей АЖ РКЭ. Для выделения и очистки вируса из ВСС нами было испытано осаждение вируса с помощью ПЭГ-6000 в 7%-ной конечной концентрации при pH 8,5 с последующим концентрированием его ультрацентрифугированием и осветлением низкоскоростным центрифугированием, концентрирование вируса методом ультрацентрифугирования и дальнейшей очисткой в градиенте плотности сахарозы.

Испытанные нами способы выделения и очистки ВГЛ из ВСС дали положительные результаты. Выделенный вирус обладал высокой гемагглютинирующей активностью в РГА 1:40960-1:409600. Осаждение вируса с помощью ПЭГ-6000 обеспечило высокий его выход (960-1230 мкг/мл) и высокую гемагглютинирующую активность препаратов вируса.

В очищенном препарате вируса определяли концентрацию белка, гемагглютинирующую активность и исследовали в электронном микроскопе JEM 100 В (Япония) с целью контроля чистоты и нативности препарата.

Выделение NP и М белков из очищенных препаратов ВГЛ

Для этого была испытана очистка вируса от НА и НА с помощью фермента бромелайна, разрушение вируса твин-эфиром в различных соотношениях, последующее осаждение NP ультрацентрифугированием и его очистка в градиенте плотности сахарозы, выделение М белка с помощью неионного детергента Тритон Х-100. Для получения растворимого полипептида М1 был применен метод Жирнова О.П.

Отработанная нами оптимальная схема выделения NP белка из очищенных препаратов ВГЛ включает следующие этапы: - вирус обрабатывали ферментом бромелайном в течение 24 ч при 37°C при соотношении вируса и фермента 9:1. Материал осветляли центрифугированием при 2000g. NP осаждали ультрацентрифугированием при 106000g в течение 90 мин и очищали через слой 30%-ной сахарозы. Очищенный препарат NP исследовали в РГА и ИФА, а также определяли концентрацию белка. Активность в ИФА очищенных препаратов NP составила 1:80-1:640, а его концентрация 123-165 мкг/мл.

Для выделения белка M1 использовали метод Жирнова О.П., в следующей последовательности: ВГЛ H7N7 очищали из вирусосодержащей АЖ методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы 12-60% с последующей обработкой протеолитическим ферментом - бромелайном. Для этого вирусосодержащую АЖ осветляли при 5000 об/мин в течение 15 мин. Затем вирус осаждали в бляшку центрифугированием при 24000 об/мин в течение 1,5 ч. Вирус ресуспендировали в 0,05М ФБР в 100-кратном объеме и очищали в ступенчатом градиенте сахарозы 12-24-36-48-60% при 20000 об/мин в течение 1 ч. Активность очищенного вируса в РГА составила 1:81920.

Для выделения вирусного нуклеотида, содержащего белок M1 вирус наслаивали на двухступенчатый градиент глицерина 10-20%, содержащий 100 mM NaCl, 5mM Трис-HCl (pH 7,2), 1% NP-40, 20 ТИЕ/мл апопротеина и центрифугировали при 20000 об/мин при 15°C в течение 2,5 ч. Полученный осадок (вирусный нуклеоид) суспендировали в 150-200 мкл 10 % глицерина, содержащего 0,2% NP-40, 100 ТИЕ/мл апопротеина, 100 mM NaCl, 10 mM фосфатно-цитратного буфера (pH 4,5). Суспензии наслаивали на 350 мкл 15% глицерина, приготовленного на воде без каких-либо добавок и центрифугировали в течение 2ч при 23000 об/мин. После центрифугирования верхний слой, содержащий матриксный белок M1, собирали. Активность в ИФА очищенных препаратов M1 белка составила 1:80-1:160, а его концентрация 75-91 мкг/мл.

Получение антисывороток к белкам NP и M ВГЛ

Специфические сыворотки к NP и M белкам ВГЛ получали на козах и кроликах.

Оценку активности и специфичности полученных антисывороток проводили методами РДП и ИФА, таблица 1.

Таблица 1 - Оценка активности и специфичности антисывороток к внутренним белкам ВГЛ в РДП и ИФА

Наименование антисыворотки	Схема гипериммунизации	Активность в РДП		Активность в ИФА	
		AgH	AgC	сыворотки	ИгG
Кроличья	1	ц-1:2	1:2-1:4	н/и	н/и
Козья	1	-	1:16	1:20480	1:20480
Козья	2	-	1:8	1:10240	1: 20480

Козья	3	-	1:16	1:20480	1:20480
Козья	4	-	1:4	1:10240	н/и

Примечания: 1 «-» – отрицательный результат. 2 «н/и» – не исследовали. 3 «АгН» – антиген нормальный. 4 «АгС» – антиген специфический.

Как видно из результатов данной таблицы 1, активность полученных антисывороток на кроликах была невысокой и составила в РДП 1:2-1:4. К тому же полученные антисыворотки оказались неспецифичны, так как показали положительный результат с нормальным антигеном.

Козья антисыворотка, полученная по 1-ой схеме гипериммунизации, была активна в РДП до разведения 1:16 и ИФА 1:20480. Выделенный из этой антисыворотки гамма-глобулин показал сравнимую активность в ИФА. Активность козьей антисыворотки, полученной по 2-ой схеме, составила в ИФА 1:10240 и РДП 1:8.

Опытами установлено, что козья антисыворотка к М белку, приготовленная по 3-ей схеме гипериммунизации показала высокую активность в РДП и ИФА составила соответственно 1:16 и 1:20480.

Приготовление специфического антигена ВГЛ для ИФА

С целью получения специфического антигена ВГЛ для прямого варианта ИФА были отработаны оптимальные способы их приготовления. Вируссодержащую суспензию нарабатывали в перевиваемой культуре клеток MDCK и РКЭ. При этом клетки MDCK инфицировали вирусом, наработанным в РКЭ, в разведениях с 1:10 до 1:100. Для приготовления антигена использовали четыре способа.

Для приготовления специфического антигена ВГЛ пригодны все испытанные нами способы. Но более активные антигены получены с использованием 2-го способа, осаждение клеточной (MDCK) фракции проводили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин, проводили концентрирование в 100 раз от первоначального объема с последующим 3-кратным термолизом и центрифугированием при 4000-4500 об/мин в течение 20-30 мин, инактивирование 0,1% формалином, где активность антигенов в РГА составила 512-2048, в РДП - 1:8-1:32, ИФА - 5120-20480.

Выделение специфических иммуноглобулинов и приготовление иммунопероксидазных конъюгатов к внутренним белкам ВГЛ

Как известно, чувствительность, специфичность и воспроизводимость ИФА находится в прямой зависимости от качества конъюгатов антител с ферментами. А качество конъюгатов, в свою очередь, зависит от активности, специфичности и чистоты применяемых для конъюгации иммуноглобулинов (IgG) или антител.

В наших опытах, выделение IgG проводили из специфической антисыворотки, полученной к NP белку ВГЛ из штамма «А/лошадь 1/Киргизия/74» (H7N7) по первой схеме.

Для выделения и очистки IgG при ВГЛ были испытаны следующие способы:

- трехкратное осаждение общей глобулиновой фракции насыщенным раствором сернокислого аммония при 40, 35 и 33% степени насыщения;
- 3-х ступенчатое осаждение альбумина и IgG различными концентрациями этилового спирта по методу Кона;
- выделение IgG из общей глобулиновой фракции на ДЭАЭ-целлюлозе.

Выделенные IgG параллельно с исходной сывороткой исследовали на активность и специфичность в РДП и ИФА, таблица 2.

Таблица 2 - Специфическая активность иммуноглобулинов, и приготовленных на их основе иммунопероксидазных конъюгатов

Метод выделения IgG	Активность в РДП		Активность в ИФА		Титр конъюгата в ИФА	Неспецифическое фоновое окрашивание
	исходной сыворотки	IgG	исходной сыворотки	IgG		
Осаждение насыщенным раствором (NH ₄) ₂ SO ₄	1:16	1:32	1:20480	1:20480	1:800	слабое
Спиртовое осаждение по Кону	1:16	1:32	1:20480	1:20480	1:800	отсутствует
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1:16	1:16	1:20480	1:10240	1:400	отсутствует

Данные представленные в таблице 2 свидетельствуют о том, что наиболее активные IgG выделены с помощью сернокислого аммония и спиртового осаждения по Кону. На основе выделенных IgG были приготовлены вирусспецифические иммунопероксидазные конъюгаты по методу Wilson и Nakane. Активность в ИФА конъюгатов, приготовленных на основе IgG, выделенных сернокислым аммонием, спиртовым осаждением по методу Кона и на ДЭАЭ-целлюлозе, составила 1:400-1:800 и соответственно рабочие титры 1:50-1:100. Но конъюгат, приготовленный на основе IgG, выделенный сернокислым аммонием, имел неспецифическое фоновое окрашивание с контрольными (нормальными) антигенами.

Отработка оптимальных параметров постановки прямого варианта ИФА для обнаружения типоспецифического антигена А ВГЛ

В ходе оптимизации условий постановки прямого варианта ИФА для обнаружения типоспецифического антигена А ВГЛ была подобрана оптимальная сенсibiliзирующая доза иммуноглобулина к типоспецифическому белку М, отработаны оптимальные рабочие дозы антигена и конъюгата к белку М. Также проведена отработка температурно-временных условий контакта иммунореагентов между собой, подобраны

солевые растворы для их разведения и изучена чувствительность и специфичность полистироловых планшетов различных фирм.

Отработанный вариант ИФА был применен нами для обнаружения антигена типа А ВГЛ в различных вируссодержащих материалах, таблица 3.

Таблица 3 - Результаты исследования в ИФА гомологичных и гетерологичных антигенов ВГЛ при идентификации типоспецифического антигена

Наименование проб	К-во исследуемых проб	Активность в ИФА	К-во положительных проб
АЖ штамма А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ	9	1:80-1:1280	9
АЖ штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ	5	1:320-1:2560	5
АЖ штамма А/Н/Л/Отар/клон1 ВГЛ (H3N8)	3	1:160-1:640	3
AgS культур. штамма А/крачка/Ю.А./61 (H5N3) ВГП	3	1:200-1:400	3
AgS культур. штамма А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ	5	1:1600-1:25600	5
AgS культур. штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ	7	1:3200-1:25600	7
AgS культур. штамма А/Н/Л/Отар/клон1 ВГЛ, (H3N8)	3	1:12800-1:25600	3
Смывы из носа от инфицированных ВГЛ животных	6	1:8-1:16	2
AgN культуральный	3	-	-
АЖ неинфицир. КЭ	3	-	-
AgS при АЧЛ	3	-	-
AgS при ИНАН	3	-	-

Примечания: 1 АЖ - аллантоисная жидкость. 2 «-» - отрицательный результат. 3 КЭ - куриные эмбрионы. 4 ВГП - вирус гриппа птиц

Как следует из результатов таблицы 3, в испытанных пробах различных подтипов ВГЛ в разработанном нами варианте ИФА с помощью конъюгата к МБ выявлен общий типоспецифический антиген типа А, в вируссодержащих органо-тканевых суспензиях (АЖ) в титрах с 1:80 до 1:2560, в смывах из носа от инфицированных ВГЛ животных в титрах 1:8-1:16, в концентрированных культуральных антигенах в титрах с 1:1600 до 1:25600. Культуральный антиген из штамма А/крачка/Ю.А./61 (H5N3) ВГП типа А показал перекрестную положительную реакцию в титре 1:200-1:400, в то же время все нормальные и гетерологичные антигены показали отрицательный результат в ИФА.

Разработка ОТ-ПЦР для идентификации и типирования подтипов Н7 и Н3 вируса гриппа лошадей

Эффективность метода ПЦР и его специфичность зависит от многих факторов, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим, специфичность и чувствительность подобранных праймеров. Однако, наиболее критическим этапом при разработке метода ПЦР, сказывающимся на его специфичности, является правильный подбор праймеров, его локализация на исследуемой ДНК или РНК.

К настоящему времени хорошо известно, что геном ВГ типа А представлен восемью фрагментами РНК, которые защищены нуклеокапсидным белком.

В наших опытах для анализа и поиска нуклеотидных последовательностей сегментов вируса гриппа типа А использовали базу данных GenBank. Было установлено, что к настоящему времени банк генов содержит более 100000 последовательностей вируса гриппа, из них более 99000 принадлежат вирусу гриппа типа А и из них более 4000 принадлежат ВГЛ, и их число с каждым днем растет.

Для идентификации ВГЛ методом ПЦР в качестве мишени нами был выбран НА-ген (гемагглютинин) ВГЛ типа А. Поиск в базе Генбанка показал наличие 2993 полных н.п. данного гена на оба подтипа ВГЛ. Множественное выравнивание последовательностей НА-гена позволило установить, что гомология между типами А, В и С равняется 24-39%, а внутри типа А 91-100%, что говорит о консервативности гена внутри типа и высокой изменчивости его между типами ВГЛ. Это даёт основание для получения праймеров и зондов, которые будут специфичны консервативной последовательности НА-гена вируса гриппа лошадей типа А, и в тоже время не будут перекрываться с последовательностями НА-генов других типов ВГ.

Конструирование и отбор специфических праймеров

При разработке метода ПЦР для идентификации ВГЛ в качестве матрицы для конструирования специфических праймеров использовали последовательность гена гемагглютинина.

В результате подбора олигонуклеотидов было сгенерировано более 20 пар праймеров на участок НА гена ВГЛ. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, иметь допустимое процентное соотношение GC-оснований – 40-60 %, температуру плавления и прогнозируемый размер ПЦР-продукта, находящийся в пределах 150-400 п.н. Нами предварительно отобраны 5 пар праймеров. После этого каждая последовательность подвергалась анализу на шпилькообразование.

Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно быть устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону отжига праймеров происходить не будет, и как следствие - ложноотрицательный результат.

При отборе праймеров особое внимание уделялось их локализации на гене. Последовательность олигонуклеотида необходимо было располагать на участках гена НА.

Таким образом, после предварительного отбора для каждого субтипа ВГЛ выбор пал только на две пары праймеров для каждого подтипа, как наиболее подходящие для постановки ОТ-ПЦР. Нуклеотидная последовательность и их основные характеристики представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Основные характеристики специфических праймеров для постановки ОТ-ПЦР на грипп лошадей

Последовательность (5'-3')	поз. на геноме	Tm, °C	GC, %
Праймеры на ген НА субтипа Н7 ВГЛ			
TGCCCCAAGCCCTGGACCAA	666	60,0	65,0
AAACTGGCGCGGTCAGGTGC	784	60,0	65,0
CAGGATCAACCGCTGAACAGA	602	60,0	52,0
TCAGGTGCTATAAAGGCCCCA	812	60,0	
Праймеры на ген НА субтипа Н3 ВГЛ			
GCATCTCCAACGACAAGCCAT	905	61,0	52,0
ATCGGAACCCATACCACCCAT	1108	61,0	52,0
AATGCTAGGAGACCCCCACTGT	252	60,0	55,0
GGCTCCACTTCTCCGTTTTG	459	60,0	52,0

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью специальных приборов - ДНК-синтезаторов ("Expedite 8909", "Applied Biosystems", США). Синтез праймера проводили поэтапным достраиванием нуклеотида, согласно его нуклеотидной последовательности.

Отработка параметров проведения ПЦР амплификации при субтипах Н7 и Н3

Эффективность метода ПЦР и его специфичность во многом зависит от буферного состава реакционной смеси, температурно-временного режима амплификации, концентрации фермента в реакционной смеси, количества ДНК матрицы, концентрации праймеров.

Для амплификации специфического ПЦР продукта при идентификации субтипов Н3 и Н7 ВГЛ было подобран оптимальный состав реакционной смеси, состоящий из: DMSO - 2 мкл, 10X ПЦР – Буфер - 2,5 мкл, MgSO₄ - 1мкл, dNTP - 0,5 мкл, Праймер F -0,5 мкл, Праймер R -0,5 мкл, Таг полимеразы - 0,5 мкл, H₂O - 12,5 мкл, кДНК - 5 мкл, Общий объем реакционной смеси 25 мкл.

В процессе исследований также был подобран оптимальный температурно-временный режим наработки ПЦР продукта, характерный только для возбудителя ВГЛ субтипов Н3 и Н7 и имеющий четко выраженные полосы ДНК в агарозном геле (таблица 5).

Таблица 5 - Рекомендуемый режим программы амплификации для обнаружения гемагглютинирина вируса гриппа лошадей, субтипов H3 и H7

Режим	Температура	Время	Число циклов
Начальная денатурация	94°C	2 мин	0 циклов
Денатурация	94°C	15 сек	25 циклов
Отжиг	57°C	15 сек	
Элонгация	72°C	45 сек	
Завершающая элонгация	72°C	5 мин	0 циклов

Определение специфичности ПЦР при идентификации субтипа H7 ВГЛ

В результате проведенных экспериментов было отобрана пара праймеров H7/602F и H7/812R, позволяющая нарабатывать участок гемагглютинирина размером 210 п.н.

Для проверки специфичности разработанной ОТ-ПЦР для идентификации субтипа H7 в качестве положительного контроля использовали штамм А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, а в качестве отрицательного - воду и гетерологичные пробы (штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, штаммы А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) и А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) вируса гриппа птиц (ВГП), штамм NIBRG-121XP (H1N1) вируса гриппа свиней (ВГС), вирусы африканской чумы лошадей (АЧЛ) и инфекционной анемии лошадей (ИНАН). Результаты представлены на рисунке 1.

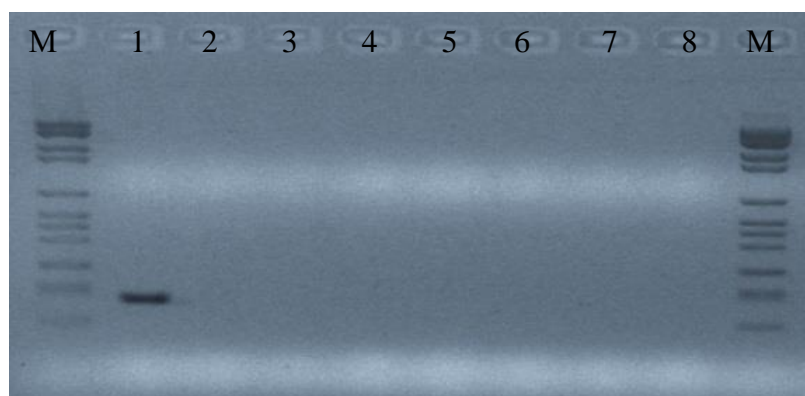


Рис. 1 Специфичность метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа H7 ВГЛ

М – маркер ДНК, 1 – РНК шт. А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, 2 – РНК шт. А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, 3 – РНК вируса африканской чумы лошадей, 4 – РНК вируса инфекционной анемии лошадей, 5 – РНК шт. А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) ВГП, 6 - РНК шт. NIBRG-121XP (H1N1) ВГС, 7 - РНК шт. А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) ВГП, 8- вода.

Как следует из данных рисунка 1, отработанный метод ОТ-ПЦР позволяет специфически выявлять НА субтипа H7 ВГЛ в искомой пробе и не даёт перекрёстных реакций со штаммами А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) ВГП, NIBRG-121XP (H1N1) ВГС, А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) ВГП, вирусами африканской чумы

лошадей (АЧЛ) и инфекционной анемии лошадей (ИНАЛ). О специфичности метода свидетельствовало отсутствие полосы ДНК в пробе с водой.

Определение чувствительности ПЦР при идентификации субтипа Н7 ВГЛ

На следующем этапе исследовании определена чувствительность разработанного метода ПЦР для субтипа Н7. Результаты проведенных опытов представлены на рисунке 2.

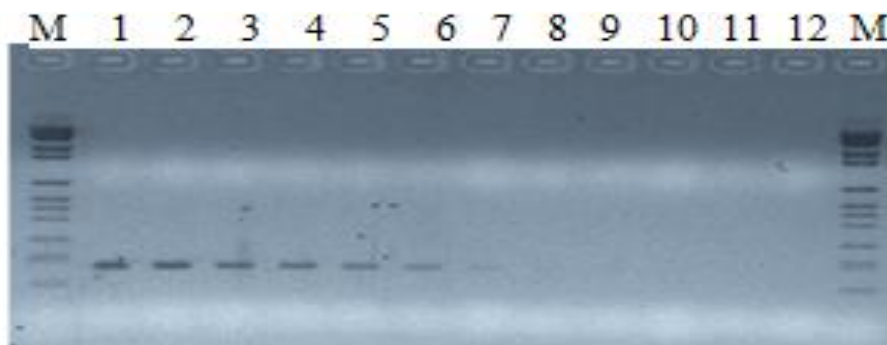


Рис. 2 Чувствительность метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа Н7 ВГЛ

М – Маркер молекулярного веса, 1 - 1:2, 2 - 1:4, 3 - 1:8, 4 - 1:16, 5 - 1:32, 6 - 1:64, 7 - 1:128, 8 - 1:256, 9 – 1:512, 10 – 1:1024, 11 – 1:2048, 12 – 1:4096

Из данных, рисунка 2 видно, что ОТ-ПЦР вирус был обнаружен в разведении 1:128.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что все положительные пробы были выявлены соответственно подобранному праймеру на субтип Н7 вируса гриппа лошадей. Подобренные синтетические олигонуклеотидные праймеры для выявления субтипа Н7 вируса гриппа лошадей показали высокую специфичность, чувствительность и пригодны для применения по идентификации гемагглютинина Н7 вируса гриппа лошадей в различных клинических образцах.

Определение специфичности ПЦР при идентификации субтипа Н3 ВГЛ

В процессе экспериментов была отобрана пара праймеров Н3/252F и Н3/459R, позволяющая нарабатывать продукт размером 207 п.н.

Для проверки специфичности разработанной ОТ-ПЦР при идентификации субтипа Н3 ВГЛ в качестве положительного контроля использовали штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, а в качестве отрицательного - воду и гетерологичные пробы (штамм А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, штаммы А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) и А/домашний/гусь/Павлодар/ 1/05 (H5N1) вируса гриппа птиц (ВГП), штамм NIBRG-121XP (H1N1) вируса гриппа свиней (ВГС), вирусы африканской чумы лошадей (АЧЛ) и инфекционной анемии лошадей (ИНАН). Результаты исследований представлены на рисунке 3.



Рис. 3 Определение специфичности метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа НЗ ВГЛ

М – маркер ДНК, 1 – РНК шт. А/лошадь/Отар/764/07 (Н3N8) ВГЛ, 2 – РНК шт. А/лошадь1/Киргизия/74 (Н7N7) ВГЛ, 3 – РНК вируса африканской чумы лошадей, 4 – РНК вируса инфекционной анемии лошадей, 5 – РНК шт. А/крачка/Южная Африка/61 (Н5N3) ВГП, 6 – РНК шт. NIBRG-121XP (Н1N1) ВГС, 7 – РНК шт. А/домашний/гусь/Павлодар/1/05 (Н5N1) ВГП, 8 – вода.

Как видно из данных, представленных на рисунке 3, разработанный метод ОТ-ПЦР позволяет специфически выявлять субтип НЗ ВГЛ в искомой пробе и не даёт перекрёстных реакций со штаммом А/лошадь1/Киргизия/74 (Н7N7) ВГЛ, вирусами африканской чумы лошадей (АЧЛ) и инфекционной анемии лошадей (ИНАН), пробами ВГ А, а также регистрировалась отрицательная реакция в пробе с водой.

Определение чувствительности ПЦР при идентификации субтипа НЗ ВГЛ

Следующим этапом наших исследований было определение порога чувствительности разработанного метода ПЦР для субтипа НЗ.

Чувствительность тест системы оценивали с титрованием вируса в РГА. Результаты проведенных опытов представлены на рисунке 4.

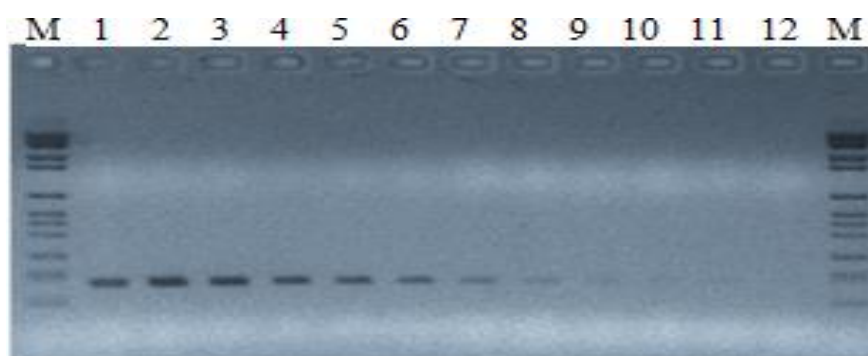


Рис. 4 Определение чувствительности метода ОТ-ПЦР при идентификации субтипа НЗ ВГЛ

М – маркер молекулярного веса, 1 – 1:2, 2 – 1:4, 3 – 1:8, 4 – 1:16, 5 – 1:32, 6 – 1:64, 7 – 1:128, 8 – 1:256, 9 – 1:512, 10 – 1:1024

Из данных, представленных на рисунке 4 следует, что в ОТ-ПЦР вирус был обнаружен в разведении 1:512.

Таким образом, опытами установлено, что все положительные пробы были выявлены соответственно подобранному праймеру на субтип Н3 ВГЛ. Подобренные синтетические олигонуклеотидные праймеры для выявления субтипа Н3 ВГЛ показали высокую специфичность, чувствительность и пригодны для применения по идентификации гемагглютиниана Н3 ВГЛ в различных клинических образцах.

Таким образом, в процессе совершенствования метода ОТ-ПЦР для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ были подобраны оптимальные условия постановки реакции амплификации и специфические праймеры, позволяющие нарабатывать ПЦР-продукт размером 210 и 207 пар нуклеотидов соответственно.

Разработка ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ

Для разработки метода ПЦР-РВ нами была выбрана технология «Taq-Man», как наиболее оптимальная по диагностике вирусных инфекций. Нами были сконструированы наборы для специфического обнаружения субтипов Н7 и Н3 ВГЛ в ПЦР-РВ в состав каждого из которых входят два праймера и зонд.

Нуклеотидные последовательности и их основные характеристики гена Н7 - Н7F797, для гена Н3 - Н3F445.

Таким образом, на основе анализа последовательностей НА-гена вируса гриппа лошадей, с использованием программы «Primer Express 2.0», было подобраны праймеры для специфического выявления ВГЛ субтипов Н7 и Н3. Моделированные последовательности праймеров и зонда были синтезированы в необходимом количестве на синтезаторе олигонуклеотидов "Expedite 8909" ("Applied Biosystems", США), согласно протоколам производителя и испытывались в экспериментах для постановки ПЦР-РВ.

ПЦР-РВ при идентификации субтипа Н7 ВГЛ

Опытом установлено, что для постановки ОТ-ПЦР-РВ наиболее рационально использовать реакционную смесь следующего состава:

PCR mix: общий объем - 20 мкл, вода до - 20 мкл, 5x буфер (Mg²⁺ 2,5 мМ) - 4 мкл, Mg²⁺ - 1мкл (3,5 мМ), дНТФ - 0,8 мкл, праймер Н7R923 - 0,5 мкл, праймер Н7F797 - 0,5мкл, проба Н7 - 0,3 мкл, enzyme - 0,8 мкл, РНК ВГЛ - 8 мкл.

Следующий температурно-временной режим:

50°C – 30мин, 95°C - 15мин, 40 циклов, 95°C – 0 с, 55°C – 5 с, 72°C - 20 с

Таким образом, опытным путем были подобраны праймеры и зонд, позволяющие выявлять специфический ПЦР-продукт субтипа Н7 методом ПЦР-РВ. Также был подобран оптимальный температурно-временной режим и компонентный состав реакционной смеси.

Определение специфичности в ПЦР-РВ при идентификации субтипа Н7 ВГЛ

Специфичность ПЦР-РВ для субтипа Н7 ВГЛ определяли, используя гетерологичные подтипы вирусов гриппа лошадей, птиц и пандемического

вируса гриппа H1. Характеристика данных вирусов и их штаммов описаны в разделе «Материалы и методы».

Результаты экспериментов по определению специфичности ПЦР в реальном времени при выявлении РНК H7 вируса гриппа лошадей представлены на рисунке 5.

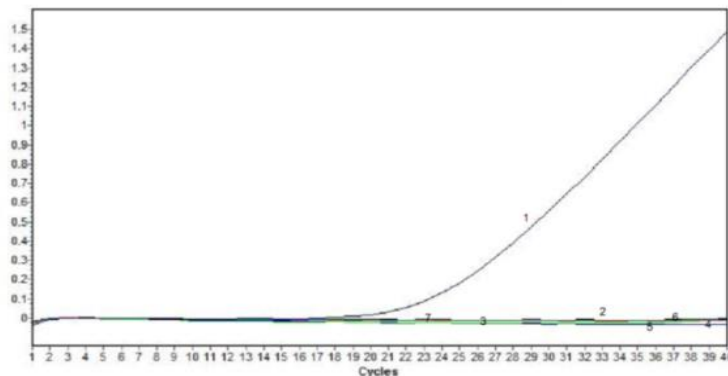


Рис. 5 Кинетические кривые ОТ-ПЦР-РВ при обнаружении РНК H7 ВГЛ

1- РНК штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, 2 - РНК штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, 3 - РНК штамма А/утка/Калифорния/72 (H3N8) ВГП, 4 - РНК штамма А/ лошадь/Майами 1/63 (H3N8) ВГЛ, 5 - РНК штамма NIBRG-121 ХР (H1N1) ВГ А, 6 – РНК штамма А/курица/СКО/5/05(H5N1) ВГП, 7 - отрицательный контроль (деионизированная вода).

Из рисунка 5 следует, что специфический рост флуоресценции наблюдался в пробе содержащей РНК субтипа H7 ВГЛ. Отсутствие флуоресцирующего сигнала наблюдали в пробах содержащих РНК субтипа H3 ВГЛ, РНК субтипов H3 и H5 ВГП и РНК субтипа H1 ВГ А. Результаты этих исследований показывают, что разработанный метод ОТ-ПЦР-РВ показал специфичные результаты.

Определение чувствительности ПЦР-РВ при идентификации субтипа H7 ВГЛ

При определении чувствительности отработанной ПЦР-РВ использовали 10-кратное разведение РНК субтипа H7 ВГЛ. Исходные пикограммы вирусной РНК переводили в копии ДНК по следующей формуле:

Число копий = 6×10^{23} (копий/моль) \times концентрация (g/ μ l) / MW(g/моль), где концентрация (g/ μ l) – концентрация образца, MW(g/моль) – молекулярный вес геномной РНК ВГЛ. Результаты проведенных опытов отражены на рисунке 6.

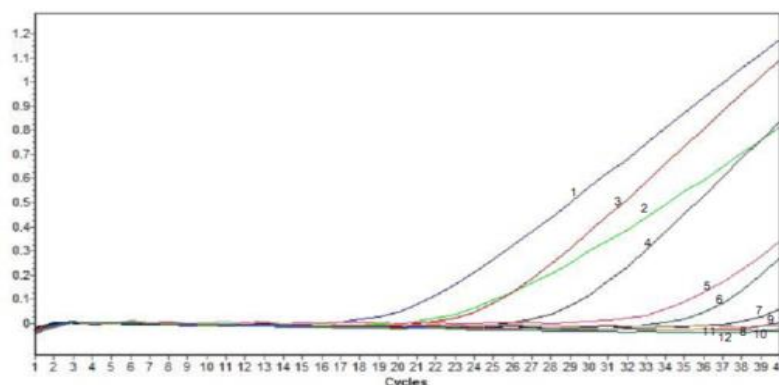


Рис. 6 Кинетические кривые ПЦР-РВ при обнаружении РНК Н7 ВГЛ

1 - 100нг/мкл; 2 - 10нг/мкл; 3 - 1нг/мкл; 4 - 100пг/мкл; 5 - 10пг/мкл; 6 - 1пг/мкл; 7 - 100фг/мкл; 8 - 10фг/мкл; 9 - 1фг/мкл; 10 - 0,1фг/мкл; 11 - 0,01фг/мкл; 12 - отрицательный контроль.

Таким образом разработанная тест-система ПЦР-РВ позволяет обнаружить РНК Н7 ВГЛ в концентрации 1пг/мкл (6×10^3 копий).

ПЦР-РВ при идентификации субтипа Н3 ВГЛ

Опытным путем установлены, что для постановки ПЦР-РВ наиболее рационально использовать реакционную смесь следующего состава:

PCR mix: общий объем -20мкл, Вода до 20мкл, 5x буфер (Mg 2+ 2,5мМ) -4мкл, Mg 2+ (4,5мМ) - 2мкл, дНТФ - 0,8мкл, праймер Н3F445 -0,5мкл, праймер Н3R530 - 0,5 мкл, проба Н3 - 0,3 мкл, enzyme - 0,8 мкл, РНК ВГЛ - 8мкл.

Температурно-временной режим: 50°C – 30мин, 95°C - 15мин, 40 циклов, 95°C – 0 с, 50°C – 0 с, 72°C - 20 с.

В результате проведенных исследований были подобраны праймеры и зонд, позволяющие выявлять специфический ПЦР-продукт субтипа Н3 методом ПЦР-РВ. Также опытним путем был подобран оптимальный температурно-временной режим и компонентный состав реакционной смеси.

В дальнейших наших экспериментах была изучена чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ.

Определение специфичности в ПЦР-РВ при идентификации субтипа Н3 ВГЛ

Специфичность ПЦР в реальном времени для субтипа Н3 ВГЛ определяли, используя гетерологичные подтипы вирусов гриппа лошадей, птиц и пандемического вируса гриппа Н1.

Результаты экспериментов по определению специфичности ПЦР в реальном времени при выявлении РНК Н3 вируса гриппа лошадей представлены на рисунке 7.

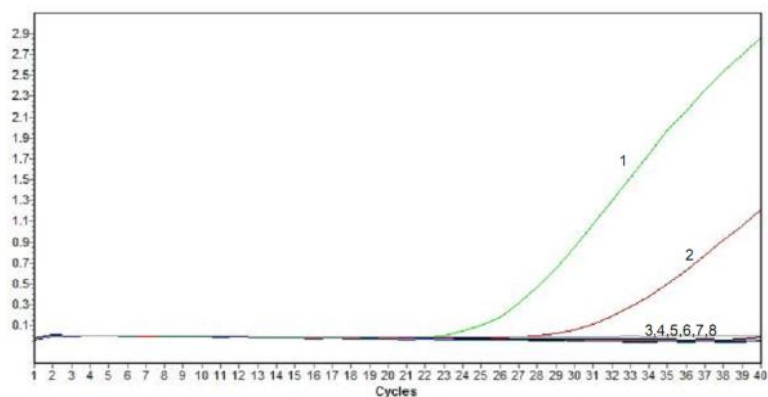


Рис. 7 Кинетические кривые ОТ-ПЦР-РВ при обнаружении РНК НЗ ВГЛ

1 - РНК штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, 2 - РНК штамма А/ лошадь/Майами1/63 (H3N8) ВГЛ, 3 - РНК штамма А/утка/Калифорния/72 (H3N8) ВГП, 4 - РНК штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, 5 - РНК штамма NIBRG-121 ХР (H1N1) ВГ типа А, 6 - РНК штамма А/курица/СКО/5/05 (H5N1) ВГП, 7 - РНК ВГ (H3N2), 8 - отрицательный контроль (деионизированная вода).

Из рисунка 7 следует, что специфический рост флуоресценции наблюдался в пробе содержащей РНК субтипа НЗ ВГЛ. Отсутствие флуоресцирующего сигнала наблюдали в пробах содержащих РНК субтипа Н7 ВГЛ, РНК субтипов НЗ и Н5 ВГП и РНК субтипа Н1 ВГ А. Результаты этих исследований показывают, что разработанный метод ОТ-ПЦР-РВ проявил высокую специфичность.

Определение чувствительности ПЦР-РВ при идентификации субтипа Н7 ВГЛ

При определении чувствительности отработанной ПЦР в реальном времени использовали 10-кратное разведение РНК субтипа НЗ ВГЛ. Для этого использовали 10-ти кратное серийное разведение РНК НЗ ВГЛ от 100нг/мкл до 0,01 фг/мкл. Результаты экспериментов представлены на рисунке 8.

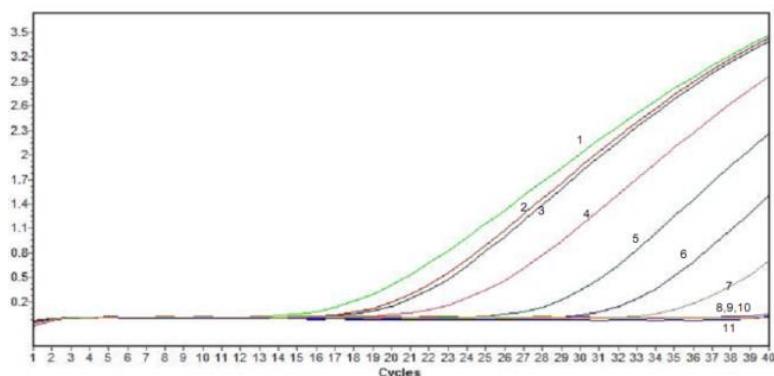


Рис. 8 Кинетические кривые ПЦР- РВ при обнаружении РНК НЗ ВГЛ

1- 100 нг/мкл; 2 - 10нг/мкл; 3 - 1нг/мкл; 4 - 100пг/мкл; 5 - 10пг/мкл; 6 - 1пг/мкл; 7 - 100фг/мкл; 8 - 10фг/мкл; 9 - 1фг/мкл; 10 - 0,1фг/мкл; 11 - отрицательный контроль

Опытами установлены, что разработанная тест-система ПЦР-РВ позволяет обнаружить РНК НЗ ВГЛ в концентрации 1 пг/мкл (6×10^3 копий).

ВЫВОДЫ

1. Отработаны условия культивирования штаммов вируса гриппа лошадей, обеспечивающие его репродукцию с сохранением инфекционной и гемагглютинирующей активности не менее 7,08-7,91 lg ЭИД₅₀/см³ и 1:1365,5 соответственно в РКЭ.

2. Отработаны оптимальные методы очистки и концентрации штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ, выделения NP и M белков, приготовлены диагностические препараты (антигены, сыворотки, иммуноглобулины, конъюгаты) для постановки ИФА.

3. Определены оптимальные условия постановки прямого варианта ИФА для выявления специфического антигена ВГЛ.

4. Проведены поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вируса гриппа лошадей, сконструированы и отобраны специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды, на основе оптимизированы условия постановки ОТ-ПЦР для амплификации субтипов Н7 и НЗ, определены специфичность и чувствительность метода для идентификации субтипов Н7 и НЗ.

5. Разработаны ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования субтипов Н7 и НЗ ВГЛ, определены специфичность и чувствительность метода.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

По завершенным исследованиям разработана и оформлена следующая научно-техническая документация:

- Тест-система [набор] для лабораторной диагностики и идентификации возбудителя гриппа лошадей методом иммуноферментного анализа, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2011 г.

- Тест-система [набор] для выявления гена гемагглютинина НЗ вируса гриппа лошадей методом полимеразной цепной реакции, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2011 г.

- Тест-система [набор] для выявления гена гемагглютинина Н7 вируса гриппа лошадей методом полимеразной цепной реакции, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2011 г.

- Методические указания по лабораторной диагностике и идентификации гемагглютинина Н7 вируса гриппа лошадей с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

- Методические указания по лабораторной диагностике и идентификации гемагглютинина НЗ вируса гриппа лошадей с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Нурабаев, С.Ш. Иммуноферментный анализ для диагностики гриппа лошадей [Текст] / Ж.К. Кошеметов, В.М. Матвеева, С.Ш. Нурабаев, А.Р. Сансызбай, Н.Т.Сандыбаев, Б.М. Хайруллин, Ж.Б. Кондыбаева // Материалы 2-ой Международной конференции. Астана Биотех. - 10-11 октября 2011. - 149 с.
2. Нурабаев, С.Ш. Антисыворотки к NP белку ВГ а и оценка их активности [Текст] / Ж.К. Кошеметов, В.М. Матвеева, С.Ш. Нурабаев, А.Р. Сансызбай, Н.Т. Сандыбаев, Б.М. Хайруллин, Ж.Б. Кондыбаева, Г.Д. Сугирбаева // Материалы 2-ой Международной конференции. Астана Биотех. - 10-11 октября 2011. - 147 с.
3. Нурабаев, С.Ш. Получение антисыворотки к РНП белку вируса гриппа лошадей типа А [Текст] / В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, С.Ш. Нурабаев, М.И. Корягина, А.Р. Сансызбай, Н.Т. Сандыбаев, Б.М. Хайруллин // Журнал «Ветеринария». Россия. - №5 (21). -2011. - С.54-56.
4. Нурабаев, С.Ш. Приготовление диагностических препаратов и оптимизация постановки ИФА для выявления вируса гриппа лошадей [Текст] / В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, А.Р. Сансызбай, С.Ш. Нурабаев, М.И. Корягина // Журнал "Ветеринария". - № 10. - 2012. - С. 58-63.
5. Нурабаев, С.Ш. Получение анисыворотки к вирусу гриппа лошадей для серологической диагностики и идентификации возбудителя [Текст] / В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, А.А.Бурабаев, С.Ш. Нурабаев // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - №3. - 2012. - С.32-36.
6. Нурабаев, С.Ш. Разработка конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу гриппа лошадей [Текст] / В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, А.Р. Сансызбай, Ж.К. Кыдырбаев, С.Ш. Нурабаев // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А. Дуйшева. №6.- 2012. - С.240-244.
7. Нурабаев, С.Ш. Разработка ОТ-ПЦР для дифференциальной диагностики гемагглютини́на Н7 вируса гриппа лошадей [Текст] / М.И. Корягина, М.С. Сейсенбаева, В.М. Строчков, В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, К.Т. Султанкулова, А.А.Бурабаев, С.Ш.Нурабаев, А.Р. Сансызбай, Сандыбаев Н.Т. // Сибирский вестник. - Россия. - №5. - 2012. - С.119-126.
8. Патент 26877 Казахстан. Способ диагностики гриппа лошадей с помощью прямого «сэндвич»- варианта твердофазного иммуноферментного анализа [Текст] / С.Ш. Нурабаев, А.Р. Сансызбай, М.И. Корягина, Ж.К. Кошеметов, М.С. Сейсенбаева, В.М. Матвеева, Опубликовано: 15.05.2013.
9. Патент 26872 Казахстан. Способ получения диагностической антисыворотки к гемагглютини́ну Н3 вируса гриппа лошадей [Текст] / С.Ш. Нурабаев, М.С. Сейсенбаева, В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, М.И. Корягина, Опубликовано: 15.05.2013.

10. Патент 26710 Казахстан. Способ диагностики гемагглютини́на НЗ вируса гриппа лошадей методом полимеразной цепной реакции [Текст] / С.Ш. Нурабаев, В.М. Матвеева, М.И. Корягина, А.Р. Сансызбай, Ж.К. Кошеметов, Н.Т. Сандыбаев, М.С. Сейсенбаева, Опубликовано: 15.03.2013.

11. Патент 28670. Казахстан. Способ диагностики вируса гриппа лошадей субтипа Н7 методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени [Текст] / С.Ш. Нурабаев, В.М. Строчков, Н.Т. Сандыбаев, М.И. Богданова, Ж.К. Кошеметов, М.С. Сейсенбаева, В.М. Матвеева, А.Р. Сансызбай. Опубликовано: 15.07.2014.

12. Нурабаев, С.Ш. Изучение репродукции вируса гриппа лошадей в перевиваемых линиях культур клеток [Текст] / С.Ш. Нурабаев, В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, Р.З. Нургазиев // «Науки, новые технологии и инновации Кыргызстана» - №10. - 2016. - С.55-58.

13. Нурабаев, С.Ш. Молекулярный метод для диагностики и типирования вируса гриппа лошадей [Текст] / С.Ш. Нурабаев, В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов, Р.З. Нургазиев // «Известия вузов Кыргызстана» - №1. - 2017. - С. 34-39.

Нурабаев Сергазы Шуратбаевичтин «Жылкылардын тумоосун аныктоодо жаны ыкмаларды иштеп чыгуу» темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикологиясы жана иммунология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынан

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: жылкылардын сасык тумоо вирусу, полимераздык чынжырлуу реакциясы, реалдуу убагындагы артка кайтаруу транскрипциясы, полимераздык чынжырлуу реакциясында артка кайтаруу транскрипциясы, иммуноферменттик анализ.

Изилдөөнүн объектиси: жылкылардын сасык тумоосунун вирусун идентификациялоодо жана типдерин аныктоодо ИФА тест-системаларын АКТ-ПЧР, АКТ-ПЧР-РУ колдонуу.

Изилдөөнүн максаты: жылкылардын сасык тумоосун диагностикалоодо ИФА, АКТ-ПЧР жана АКТ-ПЧР-РУ ыкмаларын иштеп чыгуу.

Изилдөөнүн ыкмалары: вирусологиялык, иммунологиялык, молекулярдык, вирустарды MDCK, Vero жана 11 суткалык ОТЭ клетка өсүндүлөрүндө өстүрүү.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: жылкылардын сасык тумоо вирусунун А/жылкы 1/Кыргызстан/74 (H7N7) жана А/жылкы/Отар/764/07 (H3N8) штаммдарынын культуралдык касиеттери көчүрмө клеткаларынын монослоюнда жана 11 суткалык ОТЭ-да изилденген; ЖСТ вирусу, вирустуу суспензиядан бөлүнүп, тазаланып жана

концентрацияланган; ЖСТ вирусунан тазаланып алынган препараттардан NP жана M белоктору бөлүнүп алынган, жана алардын негизинде ылаңга каршы кандын сары суулары алынган; антигендерди даярдоо, иммуноглобулиндерди бөлүп алуу жана иммунопероксидаздык конъюгаттын даярдоо ыкмалары иштелип чыккан; ЖСТ вирусунун спецификалык A антигенин табуу үчүн ИФА түз вариантын коюунун оптималдуу шарттары иштелип чыккан; ЖСТ вирусунун нуклеотиддик ырааттуулугун издөө жана анализ жүргүзүлгөн, спецификалык праймерлер жана олигонуклеотиддик зонддор конструкцияланган жана тандалган; ЖСТ вирусунун H7 жана H3 субтиптерин АКТ-ПЧРде амплификациялоо параметрлери тандалып алынган; ЖСТ вирусунун H7 жана H3 субтиптерин идентификациялоо жана типтерин изилдөө үчүн АКТ-ПЧР-Руну коюу параметрлери тандалып алынган; ЖСТ вирусунун H7 жана H3 субтиптерин идентификациялоо жана типтерин изилдөө үчүн АКТ-ПЧР жана АКТ-ПЧР-РУнун өзгөчөлүгү жана сезгичтиги аныкталган.

Колдонуу чөйрөсү: практикалык ветеринария, ветеринардык вирусология, биотехнология.

РЕЗЮМЕ

диссертации Нурабаева Сергазы Шуратбаевича
на тему: «Разработка современных средств и методов диагностики
гриппа лошадей» на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и
иммунология

Ключевые слова: вирус гриппа лошадей, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, антиген, сыворотка, белок, иммуноглобулин.

Объект исследований: тест-системы ИФА, ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования вируса гриппа лошадей.

Цель исследования: разработка диагностических методов ИФА, ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ для выявления вируса гриппа лошадей.

Методы исследований: вирусологические, иммунологические, молекулярные, культивирование вируса в культурах клеток MDCK, MDCK и 11-суточных РКЭ.

Полученные результаты и их новизна: изучены культуральные свойства штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ, штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемых линий клеток и 11-суточных РКЭ; из вирусосодержащей суспензии выделены, очищены и сконцентрированы вирус гриппа лошадей; из очищенных препаратов ВГЛ выделены NP и M белки и на их основе получены антисыворотки; отработана методика приготовления антигена, выделения иммуноглобулинов и приготовления иммунопероксидазного конъюгата; отработаны оптимальные

условия постановки прямого варианта ИФА для обнаружения специфического антигена А ВГЛ; проведены поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вируса гриппа лошадей, сконструированы и отобраны специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды; подобраны параметры проведения ОТ-ПЦР амплификации при субтипах Н7 и Н3 ВГЛ; подобраны параметры постановки ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ; определена специфичность и чувствительность ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ для идентификации и типирования субтипов Н7 и Н3 ВГЛ.

Область применения: практическая ветеринария, ветеринарная вирусология, биотехнология.

SUMMARY

dissertation Nurabaev Sergazy Shuratbaevich on the theme: "Development of modern methods of diagnostics and influenza horses" for the degree of candidate of biological sciences by specialty 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootiology, mycology and immunology with mikotoksikologiy

Keywords: influenza virus of horses, polymerase chain reaction reverse transcription real-time polymerase chain reaction is reverse transcription-linked immunosorbent assay.

The object of research: ELISA test systems, RT-PCR, RT-PCR-RV for the identification and typing of influenza virus of horses.

Purpose of the study: ELISA development of diagnostic methods, RT-PCR and RT-RT-PCR for the detection of influenza virus pathogen of horses.

Research Methods: virological, immunological, molecular, culturing the virus in cultures of MDCK cells, Vero and 11-day DCE.

The results and their novelty: studied cultural properties of the strains A / 1 horse / Kyrgyzstan / 74 (H7N7) HFV, strain A / horse / Otar / 764/07 (N3N8) HFV in a monolayer of continuous cell lines and 11- daily DCE; of virus-containing suspension of the isolated, purified and concentrated influenza virus of horses; purified preparations of isolated HFV NP and M proteins and antisera were obtained on the basis of; The technique of preparing antigen, isolation of immunoglobulins, and on the basis of preparation of immunoperoxidase conjugate; worked out the optimal conditions of a direct variant of ELISA for the detection of specific antigen A HFV; conducted search and analysis of the nucleotide sequences of influenza virus of horses, are designed and selected for specific primers and oligonucleotide probes; selected parameters of the RT-PCR amplification with subtypes H7 and H3 HFV; selected parameters setting RT-RT-PCR for identification and typing of subtypes H7 and H3 HFV; defined specificity and sensitivity of RT-PCR and RT-RT-PCR for identification and typing of H3 and H7 subtypes HFV.

Applications: practical veterinary medicine, veterinary virology, biotechnology.

Нурабаев Сергазы Шуратбаевич

**«РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ЛОШАДЕЙ»**

Объем 44,75 уч.изд.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 30

Типография ОсОО «Алтын Тамга»
720000, г. Бишкек, ул. Орозбекова, 44
Тел.: (+996 312) 62-13-10
e-mail: altyntamga@mail.ru