

УДК 619:616.98:578.833.3-076

Діагностика вірусного артеріїту коней методом полімеразної ланцюгової реакції: можливі помилки

В.В. Куликова, кандидат ветеринарних наук

Інститут ветеринарної медицини НААН

Наведено матеріали щодо діагностики вірусного артеріїту коней та аналіз можливих помилок при діагностиці цього захворювання методом полімеразної ланцюгової реакції. Розкриті питання взяття і підготовки клінічного та патологічного матеріалу для дослідження.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, вірусний артеріїт коней, діагностика, контамінація, аналіз, можливі помилки

ДНК–діагностика – є однією із найсучасніших високотехнологічних методів дослідження, яка об'єднує декілька методів дослідження, один з них – метод ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція). ДНК–аналізи широко застосовують у діагностиці інфекційних захворювань, що дозволяє виявляти навіть поодинокі мікроорганізми в організмі людей та тварин.

Головна перевага цього методу – високий рівень чутливості та специфічності до зразка, який досліджується, пряме виявлення об'єкта тестування, можливість повної автоматизації процесу дослідження [2].

Для діагностики вірусного артеріїту коней лабораторією вірусних хвороб коней Інституту ветеринарної медицини НААН запропонований метод зворотно – транскриптазної ПЛР (ЗТ–ПЛР). У процесі оптимізації умов постановки ЗТ–ПЛР були перевірені різні режими ампліфікації, застосовані буферні розчини, різна концентрація праймерів, іонів магнію та дНТФ. Під час визначення вірусу артеріїту у суспензіях з різною інфікованістю за допомогою двох пар праймерів (DE+DI) та (SE+SI) кДНК вірусу була виявлена у зразках, що вміщують 0,1–10 ТЦД₅₀/см³ та 1–10 фг/см³ віріонної РНК. Використання ЗТ–ПЛР з внутрішніми праймерами (SI+DI) дозволило підвищити чутливість і специфічність методу та виявити

специфічні продукти ампліфікації у дослідних пробах еякуляту, відібраних від жеребців.

Таким чином, при проведенні ПЛР необхідно дотримуватися ряду умов і мати досвід роботи у молекулярно – генетичних лабораторіях. Також важливим фактором є усвідомлення дослідником, який раніше працював у бактеріологічних та вірусологічних лабораторіях, що вона відрізняється підходом до роботи. В результаті цього можливе одержання недостовірних результатів.

Метою дослідження було проведення аналізу типових помилок, які можуть мати місце при діагностиці вірусного артеріїту коней методом ПЛР.

Матеріали та методи роботи. При роботі у ПЛР–лабораторії під час дослідження на вірусний артеріїт коней ми припускалися помилок, які можна розділити на переданалітичні, аналітичні та постаналітичні [1].

Першою умовою для проведення будь–якого аналізу є дотримання правил взяття, зберігання та транспортування клінічного матеріалу [3].

Клінічний матеріал для дослідження тварин на вірусний артеріїт коней методом ПЛР відбирали у стерильні пробірки з герметичними кришками.

Для дослідження використовували стабілізовану кров, яку відбирали із яремної вени в кількості 4,5 см³ стерильним шприцем. У нього попередньо набирали 0,5 см³ стерильного 4%–вого розчину цитрату натрію, переносили у пробірку, обережно перемішували, зберігали до проведення досліджень протягом доби за температури від +2 до +8°C [9].

Для відбору змивів з носової порожнини використовували ватні тампони. Паличку з накрученим тампоном вводили у носову порожнину, прокручували проти часової стрілки один раз і поміщали у стерильну пробірку з 5 см³ фізіологічного розчину. Не рекомендується використовувати тампони з дерев'яними паличками, які можуть містити субстрати, що інактивують віруси та інгібують ПЛР.

Для відбору еякуляту від жеребців використовували штучну вагіну.

При дослідженні патологічного матеріалу відбирали зразки легенів, селезінки, печінки, нирки, серця, навколоплідної оболонки. Шматочки органів масою 5 – 10 г вміщували у стерильні пробірки. Кров та змиви з носової порожнини зберігали та транспортували до лабораторії у замороженому стані [7]. Проби патологічного матеріалу та еякулят транспортували у термоконтейнері з льодом. Шматочки печінки, селезінки, нирки, трахеї, плаценти, легень подрібнювали ножицями, десятикратний об'єм стерильного охолодженого розчину Хенкса додавали для одержання 10%-вої суспензії та розтирали у стерильній охолодженій фарфоровій ступці із стерильним скляним піском. Після одержання гомогенату його тричі заморожували та розморожували при температурі від мінус 20°C до плюс 37°C з подальшим центрифугуванням у рефрижераторній центрифугі при 600g протягом 10 хвилин. Відібрану надосадову рідину обробляли антибіотиками із розрахунку 1000 мкг/см³ стрептоміцину, 1000 од/см³ пеніциліну, 50 од/см³ ністатину та 50 од/см³ канаміцину і залишали на 60 хвилин у темному місці. Після контакту із антибіотиками суспензію центрифугували другий раз у рефрижераторній центрифугі при 800g протягом 20 хвилин. Одержану надосадову рідину перевіряли на стерильність шляхом посіву її на поживні середовища (МПА, МПБ, середовище Кітт–Тароцці) і спостерігали протягом 10 діб (ДСТУ 4483-2005) [8].

До проб еякуляту додавали десятикратний об'єм стерильного охолодженого розчину Хенкса для одержання 10%-вої суспензії і розтирали у стерильній охолодженій фарфоровій ступці з стерильним скляним піском та центрифугували при 300g протягом 5 хвилин. Осад вилучали, супернатант використовували для виділення РНК.

Оскільки метод ПЛР дозволяє точно виявити причину захворювання, а саме збудника хвороби, матеріал треба брати безпосередньо у місці передбаченої його локалізації [5].

Другою помилкою цього етапу є неправильне взяття матеріалу для дослідження. Загальними вимогами для взяття біологічного матеріалу є максимальна концентрація збудника у дослідному зразку, а також відсутність домішок, які можуть інгібувати ПЛР [4].

Так, наприклад, при взятті матеріалу у жеребців (сперми) необхідно виключати такі інгібуючі домішки як слиз, кров, гній. Тому зішкрібки беруть не раніше ніж через 2 години після сечовипускання. Надлишок слизу та гною треба видаляти за допомогою стерильного ватного тампона або бинта безпосередньо перед взяттям біологічного матеріалу.

Для запобігання згортанню крові під час транспортування зразка необхідно використовувати антикоагулянти (4%-вий розчин цитрату натрію).

Третьою помилкою є температура зберігання біологічного матеріалу, строки доставки у лабораторію, якщо транспортування зразків потребує багато часу. Тому зразки потрібно зберігати за температури від +2 до +8°C. Для тривалішого зберігання необхідне заморожування, за винятком крові [6].

Заморожувати можна тільки один раз, тому що відбувається руйнування нуклеїнових кислот.

Для запобігання аналітичних помилок ПЛР – діагностики важливим є відсутність контамінації при проведенні дослідження, неправильне поводження з позитивними зразками. Так, наприклад, при проведенні гель – електрофорезу для візуалізації результату, кімната, в якій це відбувається, обов'язково має мати окремий вхід та систему вентиляції, якщо це не передбачено, то існує висока вірогідність потрапляння ампліконів із відкритих пробірок в інші приміщення. З часом буде більше зустрічатися позитивних дослідних зразків. На перших етапах негативний контроль може залишатися чистим, оскільки поява сумнівно позитивних результатів носить статистичний характер.

З метою запобігання крос – контамінації рекомендуємо для внесення зразків використовувати наконечники із фільтрами. Також існує загроза

занесення інгібіторів у пробу в результаті неакуратної роботи, наприклад, тальк з гумових рукавичок [6].

Постаналітичні помилки вважаються суб'єктивними. При детекції з використанням гель-електрофорезу існує ризик прийняти неспецифічні фрагменти за специфічні, якщо вони близькі за довжиною та немає можливості порівняти їх з позитивним контролем (маркером).

Під час внесення зразків у лунки необхідно також міняти наконечники для запобігання контамінації. При внесенні одним наконечником існує ризик контамінації на етапі детекції, якщо наконечник погано промивався і одна із проб виявилася з дуже високою концентрацією нуклеїнової кислоти.

Такий вид контамінації легко відстежити у випадку, якщо смуга спостерігається у негативній пробі, однак вона не відрізняється від контамінації в лабораторії та потребує повторної перевірки всіх зразків, що досліджуються.

Висновок. Запобігання помилкам при діагностиці вірусного артеріїту методом ПЛР полягає в осмисленні проведення, підготовці, володінні певною практикою та знаннями про особливості та можливості цього методу. Головною умовою запобігання переданалітичних помилок при дослідженні методом ПЛР є дотримання правил взяття, зберігання та транспортування клінічного матеріалу. Основними умовами запобігання аналітичних та постаналітичних помилок є виключення крос-контамінації та правильне поводження з позитивними зразками.

Запропонована ЗТ–ПЛР є точною та специфічною реакцією для дослідження тварин на вірусний артеріїт коней; сучасний метод діагностики – ПЛР планується використати для проведення епізоотологічного моніторингу вірусного артеріїту коней на території України.

Список літератури

1. Culliname A.A. Equine arteritis virus in an imported stallion / A. A. Culliname // Vet. Rec. – 1993. – P. 132–395.

2. Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction – ELISA / A. Ramina, Dalla Valle L., De Mas S. [et al.] // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.* – 1999. – Vol. 22. – P. 187–197.
3. Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay / S. A. Gilbert, P.J. Timoney, W.H. McCollum [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 2181–2193.
4. Horner G. Equine viral arteritis control scheme: a brief review with emphasis on laboratory aspects of the scheme in New Zealand / G. Horner // *New Zealand Veterinary Journal.* – 2004. – Vol. 52, № 2. – P. 82–84.
5. Larsen L. E. Phylogenetic characterisation of the G(L) sequences of equine arteritis virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of equine viral arteritis in Denmark / L.E. Larsen, T. Storgaard, E. Holm // *Vet. Microbiol.* – 2001. – Vol. 80. – P. 339–346.
6. Larska M. Molecular epizootiology of equine arteritis virus isolates from Poland / M. Larska, J. Rola // *Vet. Microbiol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 1796–1798.
7. Mumford J.A. Preparing for equine arteritis / J.A. Mumford // *Equine Vet. J.* – 1985. – Vol. 17. – P. 6–11.
8. Snijder E.J. The molecular biology of arteriviruses / E. J. Snijder, J. M. Meulenbergh // *Journal of General Virology.* – 1998. – Vol. 79. – P. 961–979.
9. Sekiguchi K. Detection of equine arteritis virus (EVA) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EVA strains by restriction enzyme analysis of PCR products / K. Sekiguchi, S. Sugita, F. Fukunaga // *Arch. Virol.* – 1995. – Vol. 140. – P. 1483–1491.

Диагностика вирусного артериита лошадей методом полимеразной цепной реакции: возможные ошибки

В.В. Куликова

Приведены материалы, содержащие примеры возможных ошибок при постановке полимеразной цепной реакции для диагностики вирусного артериита лошадей. Рассмотрены вопросы взятия и подготовки клинического и патологического материала для исследования.

Ключевые слова: *полимеразная цепная реакция, вирусный артериит лошадей, диагностика, контаминация, анализ, возможные ошибки*

Diagnostic of Equine viral arteritis by the method of polymerase chain reaction: possible mistakes

V.V. Kulykova

It is shown the material of examples of possible mistakes that could be occurred using the polymerase chain reaction for the Equine viral arteritis' diagnostic. The practical aspects are shown of receiving and preparing of the clinical and pathological material for researching.

Keywords: *polymerase chain reaction, Equine viral arteritis, diagnostic, contamination, analysis, possible mistakes.*