

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ПРИ ИНДИКАЦИИ ДНК ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КОМБИКОРМЕ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-РВ

Д.А. КУДРЯШОВ, С.А. КАТОРКИН, Е.В. АРОНОВА, О.Н. БУРДИНСКАЯ,
Ю.П. МОРГУНОВ, И.Х. ГАЗАЕВ, С.Ж. ЦЫБАНОВ, Д.В. КОЛБАСОВ

Известно, что распространение вируса африканской чумы свиней (АЧС) происходит при алиментарной передаче возбудителя (например, вследствие использования контаминированных вирусом пищевых и боенских отходов, не подвергнутых термической обработке, комбикормов, не прошедший ветеринарно-санитарную экспертизу и поступающий из районов, неблагополучных по АЧС, в случаях, когда перевозка комбикорма осуществлялась в транспортных средствах, не подвергшихся ветеринарно-санитарной обработке). При анализе комбикормов с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) одно из требований заключается в тщательной очистке образцов от крупных частиц и различных химических примесей, которые могут ингибировать реакцию, изменять свойства сорбента и мембранных фильтров на стадии выделения нуклеиновых кислот. Наша цель заключалась в разработке методики пробоподготовки с использованием мембранных фильтров для изучения возможности индикации ДНК вируса африканской чумы свиней в искусственно контаминированном комбикорме с помощью ПЦР. Для контаминации использовали кровь от свиньи, экспериментально зараженной вирусом АЧС (штамм Ставрополь 2009) с инфекционным титром $5,0 \lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$. Рабочие разведения вирусосодержащего материала — 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 $\lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$. Подготовка проб включала фильтрование через марлю, замораживание-оттаивание, низкоскоростное центрифугирование и разделение на фильтрах с диаметром пор 450 мкм. Последующее выделение ДНК вируса АЧС и ПЦР-РВ выполняли согласно инструкции по применению соответствующей разработанной тест-системы. Установлено, что в подготовленных предложенным способом пробах искусственно контаминированного комбикорма ДНК вируса АЧС выявляется в материале с титром вируса не менее $3,0 \lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$. Таким образом, включение в диагностическую схему рекомендуемой стадии подготовки проб, описанной выше, при анализе комбикорма позволяет получить очищенный от примесей и сконцентрированный материал, который может быть использован для дальнейших исследований на наличие ДНК вируса АЧС с помощью ПЦР-РВ.

Ключевые слова: африканская чума свиней, АЧС, вирус африканской чумы свиней, комбикорм, пробоподготовка, мембранные фильтры, ПЦР в реальном времени, ПЦР-РВ.

Африканская чума свиней (АЧС) — особо опасное высококонтагиозное заболевание, из-за участвовавших вспышек которого вопросы диагностики, механизмов патогенеза, эпизоотический мониторинг требуют постоянного внимания специалистов (1-5). Вирус АЧС, который относится к наиболее опасным и экономически значимым патогенам, передается в основном алиментарно (6, 7). Этот способ подразумевает использование для кормления пищевых и боенских отходов, не подвергнутых термической обработке, которые контаминированы вирусом (6). Кроме того, источником заражения может служить комбикорм, не прошедший ветеринарно-санитарную экспертизу и поступающий из районов, неблагополучных по АЧС (8). Перевозка комбикорма в транспортных средствах, не подвергшихся ветеринарно-санитарной обработке, хранение в помещениях, инфицированных возбудителем, также может привести к попаданию в него вируса и, как следствие, к заражению поголовья.

Таким образом, поставка комбикорма, контаминированного вирусом АЧС, в благополучные по инфекции регионы, представляет серьезную угрозу для свиноводческих хозяйств как в промышленном, так и в частном секторе. При анализе комбикормов с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) одно из требований заключается в тщательной очистке образцов от крупных час-

тиц и различных химических примесей, которые могут ингибировать реакцию, изменять свойства сорбента и мембранных фильтров на стадии выделения нуклеиновых кислот (НК).

Следует также отметить, что масса образцов комбикорма, поступающих в лабораторию, составляет 3-5 кг, и из-за неравномерного распределения возбудителя в таком большом объеме исследуемого материала существует проблема формирования средней пробы (9). Поэтому возникает необходимость введения дополнительной стадии пробоподготовки при индикации генома вируса АЧС в комбикорме с помощью ПЦР-РВ.

Общая схема пробоподготовки комбикорма была разработана ранее Н.А. Лагуткиным с соавт. (10). Однако эта схема не оптимизирована для конкретного возбудителя (вируса АЧС) и не применялась при исследовании проб комбикорма с помощью ПЦР-РВ.

Наша цель заключалась в разработке методики пробоподготовки с использованием мембранных фильтров для изучения возможности индикации ДНК вируса африканской чумы свиней в искусственно контаминированном комбикорме с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Методика. В эксперименте использовали комбикорм для свиней, в состав которого входят отруби пшеничные, ячмень 2-го класса, мука ячменная, мел кормовой, жмых подсолнечный, премикс П55 (КК-55 комбикорм для мясного откорма свиней, «Агрос», Россия). Навески комбикорма (4 шт. по 300 г) контаминировали вирусосодержащей кровью (30 см³ на каждую пробу), которую получали от свиньи, экспериментально зараженной вирусом АЧС (штамм Ставрополь 2009). Инфекционный титр в исходном препарате крови составлял 5,0 lg ГАЕ₅₀/см³ (1-я навеска), 2-ю навеску контаминировали разведением вирусосодержащего материала с титром 4,0; 3-ю — с титром 3,0 и 4-ю — 2,0 lg ГАЕ₅₀/см³. Комбикорм тщательно перемешивали для равномерного распределения вирусосодержащего материала по всей массе.

Для элюции вируса в комбикорм добавляли стерильный физиологический раствор в соотношении 1:5 (масса/объем) и перемешивали в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Для отработки условий концентрирования и очистки вируса использовали 1-ю навеску комбикорма. Суспензию фильтровали через 8 слоев стерильной марли. Затем полученную жидкость разделили на три аликвоты. Аликвоту № 1 однократно замораживали при температуре -60 °С. После оттаивания при комнатной температуре пробы осветляли низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Eppendorf 5804 (Германия). Полученный супернатант пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 450 мкм (ФМНЦ-0,45) («Владисарт», Россия). Для аликвоты № 2 исключали этап замораживания-оттаивания. Пробу центрифугировали при вышеуказанных условиях, полученный супернатант фильтровали. Аликвоту № 3 фильтровали без предварительного замораживания-оттаивания и центрифугирования.

Следующий этап пробоподготовки был одинаковым для всех аликвот: фильтры измельчали в стерильной фарфоровой чашке со стерильным стеклом; добавляли 0,2 см³ деионизированной воды и 1,0 см³ лизирующего буфера, входящего в состав набора для выделения нуклеиновых кислот («Тест-система для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени», разработка и производство Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии) (11). Полученную жидкость отбирали в чистые пробирки объемом 1,5 см³, центрифугировали при 13 400 об/мин в

течение 30 с на центрифуге Eppendorf mini spin (Германия). Супернатант использовали для выделения НК.

Остальные навески комбикорма (со 2-й по 4-ю) подвергались всем перечисленным процедурам подготовки: приготовление суспензии, фильтрование через марлю, замораживание-оттаивание, центрифугирование, осаждение на мембранном фильтре, получение супернатанта для дальнейшего выделения НК.

ДНК выделяли по модифицированной методике R. Boom с соавт. (12). Постановку ПЦР-РВ осуществляли в амплификаторе Rotor Gene 6000 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией по применению тест-системы для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени (11). Учет результатов ПЦР проводили, анализируя кривые накопления флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения используемого амплификатора.

Результаты. Выбор диаметра мембранного фильтра основывался на данных, полученных А. Lucas с соавт. (13) в опытах по фильтрованию крови и сыворотки через фильтры Шамберлана, Беркефельда и Зейтца с разным диаметром пор (300, 450, 500, 1000 мкм). Авторами было установлено наличие вируса в фильтрах при диаметре пор 300 и 450 мкм и его отсутствие в фильтрах при диаметре пор 500 и 1000 мкм (7).

При сравнении различных вариантов подготовки проб с исключением некоторых стадий оказалось, что в этих случаях поры фильтра забивались крупными и вязкими частицами комбикорма (аликвоты № 2 и № 3), что делало невозможным накопление фильтрата для последующего выделения НК и постановки ПЦР-РВ. При сохранении всех этапов (аликвота № 1) был получен фильтрат, который использовали на дальнейших стадиях выявления ДНК вируса АЧС с помощью ПЦР-РВ.

В ПЦР-РВ на матрицах ДНК, выделенных из 1-й (аликвота № 1), 2-й, 3-й и 4-й навески комбикорма, положительный результат регистрировали в 1-3-м образцах (рис.). В пробе № 4, контаминированной кровью с наиболее низким титром вируса ($2,0 \text{ IgГAE}_{50}/\text{см}^3$), геном вируса АЧС не обнаружили.

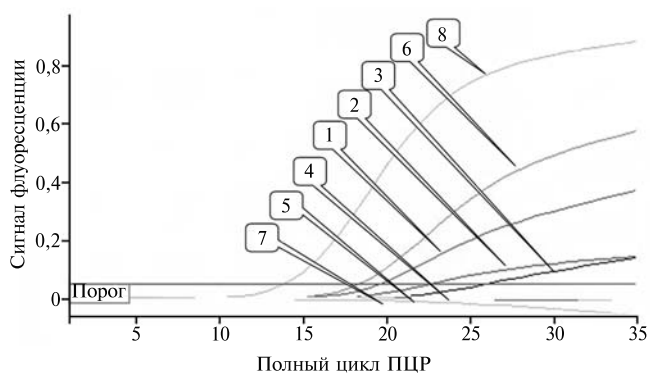


График накопления флуоресцентного сигнала при использовании ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для анализа образцов комбикорма, контаминированных инокулятами вируса африканской чумы свиней с разным инфекционным титром: 1 — 1-я навеска (аликвота № 1), 2-4 — соответственно 2-4-я навески, 5 — отрицательный контроль выделения ДНК, 6 — положительный контроль выделения ДНК, 7 — отрицательный контроль ПЦР-РВ,

8 — положительный контроль ПЦР-РВ (подробное описание условий инокуляции и оптимизированной подготовки проб см. в разделе «Методика»).

Значения порогового цикла, зарегистрированные при исследовании 1-3-й навесок комбикорма, находились в прямой зависимости от величины инфекционного титра вируса в образцах: для 1-й навески величина C_t была наименьшей и равнялась 19,60, тогда как у 3-й навески достигала максимального значения, равного 25,91 (табл.).

Средние значения порогового цикла (C_t) при использовании ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) для анализа образцов комбикорма, контаминированных инокулятами вируса африканской чумы свиней с разным инфекционным титром ($n = 3$)

№ пробы	Образец	C_t
1	1-я навеска комбикорма (аликвота № 1)	19,60
2	2-я навеска комбикорма	22,64
3	3-я навеска комбикорма	25,91
4	4-я навеска комбикорма	н.з.
5	Отрицательный контроль выделения ДНК	н.з.
6	Положительный контроль выделения ДНК	18,35
7	Отрицательный контроль ПЦР-РВ	н.з.
8	Положительный контроль ПЦР-РВ	13,88

Примечание. Подробное описание условий инокуляции и оптимизированной подготовки проб см. в разделе «Методика»; н.з. — нет значения C_t .

Таким образом, при исследовании комбикорма на наличие генома вируса африканской чумы свиней (АЧС) с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в диагностическую схему рекомендуется включать стадию подготовки проб, состоящую из приготовления суспензии, фильтрования через марлю, замораживания-оттаивания, низкоскоростного центрифугирования и осаждение на фильтрах с диаметром пор 450 мкм. Проведение полного цикла пробоподготовки комбикорма позволяет получить очищенный от примесей и сконцентрированный материал, который может быть использован для дальнейших исследований на наличие ДНК вируса АЧС с помощью ПЦР-РВ. В подготовленных таким способом образцах ДНК вируса АЧС выявляли при титре от 3,0 lg ГАЕ₅₀/см³.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L. African swine fever diagnosis update. *Dev. Biol. (Basel)*, 2013, 135: 159-165 (doi: 10.1159/000189240).
2. Nigsch A., Costard S., Jones B.A., Pfeiffer D.U., Wieland B. Stochastic spatio-temporal modelling of African swine fever spread in the European Union during the high risk period. *Prev. Vet. Med.*, 2013, 108(4): 262-275 (doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.11.003).
3. Atuhaire D.K., Afayo M., Ochwo S., Mwesigwa S., Mwiine F.N., Okuni J.B., Olaho-Mukani W., Ojok L. Prevalence of African swine fever virus in apparently healthy domestic pigs in Uganda. *BMC Vet. Res.*, 2013, 9: 263 (doi: 10.1186/1746-6148-9-263).
4. De Carvalho Ferreira H.C., Backer J.A., Weesendorp E., Klinkenberg D., Stegeman J.A., Loeffen W.L. Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions. *Vet. Microbiol.*, 2013, 165(3-4): 296-304 (doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.026).
5. Gómez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Sánchez-Cordón P.J., Carrasco L. Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 140-149 (doi: 10.1016/j.virusres.2013.01.017).
6. Бакулов И.А. Африканская чума свиней. М., 1969.
7. Козлова Д.И., Бесхлебнов В.А. Современные проблемы африканской чумы свиней. М., 1980.
8. Атражева Т.А. Ветеринарно-санитарная оценка комбикормов, используемых в кормлении свиней. В кн.: Пути повышения качества продуктов животноводства и их ветеринарно-санитарная оценка. Киев, 1981.
9. ГОСТ 13496.0-80 «Комбикорма, сырье, методы отбора проб». М., 1980.
10. Руководство по индикации особо опасных болезней сельскохозяйственных животных в объектах ветеринарного надзора и окружающей среды /Под ред. Н.А. Лагуткина, В.Н. Смирнова, В.В. Куриннова, С.Ж. Цыбанова. М., 2000.
11. Газаев И.Х., Елсукова А.А., Синдрякова И.П., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В. Применение метода ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса африканской чумы свиней. В сб.: Молекулярная диагностика-2010. М., 2010: 83-85.
12. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(3): 495-503.

13. Lucas A., Haag J., Larenaudie B. La peste porcine africaine. Collection de monographies. Paris, 1967.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии,
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: kolbasovdenis@gmail.com, is.gazaev@mail.ru

Поступила в редакцию
31 марта 2014 года

THE USE OF MEMBRANE FILTERS IN DETECTION OF THE ASF VIRUS DNA IN THE FEED COMPOUND BY RT-PCR

D.A. Kudryashov, S.A. Katorkin, E.V. Aronova, O.N. Burdinskaya, Yu.P. Morgunov, I.Kh. Gazaev, S.Zh. Tsybanov, D.V. Kolbasov

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail kolbasovdenis@gmail.com, is.gazaev@mail.ru
Received March 31, 2014 doi: 10.15389/agrobiology.2014.4.75eng

Abstract

For African swine fever (ASF) virus an alimentary transmission way is known to be characteristic. In particular, the infection occurs because of use of the contaminated domestic and slaughtering wastes or the feed compounds originated from epizootic region which have not been duly controlled, or in case the package used for feed transportation were not treated against African swine virus. Under feed compound analysis by real-time PCR (RT-PCR), the samples must be free from large particles and chemical substances which can inhibit the polymerase reaction and influence the sorbent and membrane properties during nucleic acid isolation. We aimed to improve the feed compound processing technique by using membrane filters to prepare the samples for further RT-PCR indication of ASF virus. In the experiments, the feed was artificially contaminated by blood of a swine previously infected by the ASF virus Stavropol 2009 strain, the titer of 5.0 lg HAD₅₀/sm³. Also the dilutions of 2.0, 3.0 and 4.0 HAD₅₀/sm³ were tested. During processing, the crud filtration, freezing-defrostation procedure, centrifugation and separation on membrane filters (450 μm) were applied. Then the ASF virus DNA isolation and PCR-RT were conducted using the developed test-system and procedure. It was found out that the ASF virus DNA can be detected by the proposed method in the feed compound when the titer of virus used for artificially contaminated is at least 3.0 lg HAD₅₀/sm³. So, the modifying procedure of fodder sample preparation described hereinabove is effective to obtain purified and concentrated material for further ASF virus DNA analysis.

Keywords: African swine fever, ASF, African swine fever virus, feed compound, sample preparation, membrane filters, RT-PCR.

Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология» выполняет рассылку электронных отписок опубликованных статей

Для получения электронного отписка Вам необходимо:

- ❖ отослать точное описание заказа (авторы и название статьи, год, номер журнала, страницы) по адресу agrobiol@mail.ru, указав Ваши фамилию, имя, отчество (полностью), город, где проживаете, контактные e-mail и телефон;
- ❖ получить из редакции по своему e-mail подтверждение заказа (с присвоенным ему номером);
- ❖ оплатить услугу, указав в платежном документе в графе «Назначение платежа» присвоенный заказу номер и Ваши фамилию, имя, отчество.

Отписки высылаются на Ваш контактный e-mail после зачисления оплаты на счет редакции.

Банковские реквизиты редакции:

Получатель: ИНН 7708051012 Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология», Марьиноорошинское ОСБ 7981, г. Москва, р/с 40703810638050100603	Банк получателя: Сбербанк России ОАО г. Москва, БИК 044525225, к/с 30101810400000000225
--	---

В назначении платежа укажите номер заказа, Ваши фамилию, имя, отчество.

Стоимость услуги:

- ❖ один оттиск — 120 руб.,
- ❖ не более шести отписок (абонемент) — 360 руб.,
- ❖ не более двенадцати отписок (абонемент) — 700 руб.

НДС не облагается. Абонементное обслуживание предполагает предоставление указанного числа отписок за период не более каждого текущего года по предоплате.

E-mail для заказа электронных отписок — agrobiol@mail.ru

© Электронные отписки являются интеллектуальной собственностью редакции журнала «Сельскохозяйственная биология». Внесение в них каких бы то ни было изменений и дополнений не допускается. Перепечатка, тиражирование, размещение в средствах информации, в том числе электронных и сети Интернет, а также коммерческое распространение возможны только с разрешения редакции.