

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент

Мальчик О.В., научный сотрудник

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», г. Минск

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРЕХ СИСТЕМ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ PRDC-КОМПЛЕКСА

### Резюме

В статье приведены данные по качественной и количественной оценке ДНК/РНК, полученных при использовании трех разных наборов для выделения. Представлены сравнительные результаты ПЦР с праймерами к трем бактериальным и двум вирусным инфекциям. Проведена сравнительная оценка.

**Ключевые слова:** свиньи, респираторная патология, ПЦР, PRDC-комплекс, диагностика.

### Summary

The article presents data on the qualitative and quantitative assessment of DNA/RNA obtained using three different isolation kits. Comparative results of PCR with primers for three bacterial and two viral infections are presented. A comparative assessment was carried out.

**Keywords:** pigs, respiratory pathology, PCR, PRDC complex, diagnostics.

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Под PRDC-комплексом подразумевают возбудителей, вызывающих респираторную патологию у свиней разного возраста. В зависимости от географического расположения и благополучия местности наиболее часто к таким возбудителям относят следующие виды бактерий: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida* и *Streptococcus suis*, из вирусных возбудителей – цирковир свиней 2-го типа, вирусы репродуктивного и респираторного синдрома свиней, вирус гриппа, вирус болезни Ауески, цитомегаловирус, рота- и коронавирусы [1, 2, 3].

Эффективная система выделения нуклеиновых кислот позволяет грамотно и корректно проводить лабораторно-диагностические исследования. В рамках современных реалий (интенсификации любого производства, замкнутых циклов и длительного использования помещений с быстрой сменой поголовья) наша задача –

определить систему выделения, которую мы сможем использовать для комплексной ПЦР-диагностики [4, 5].

На сегодняшний день существуют системы, которые эффективны в выделении ДНК и выделении РНК, а также системы, позволяющие выделять и ДНК, и РНК согласно инструкциям по применению.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были выбраны три системы, базирующиеся на жидкофазном выделении:

- набор для выделения ДНК/РНК («Ветфактор», Россия);
- набор для выделения ДНК/РНК «Рибосорб» («Амплиценс», Россия);
- набор для выделения РНК («АртБиоТех», Беларусь), взят для работы в качестве экспериментального образца, так как в инструкции прописана возможность выделения ДНК.

Выделение проводили согласно инструкциям к наборам. Выделенные пробы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Исследовали патологический материал от поросят разного возраста из хозяйства Гродненской области (абортплод, мертворожденный, трупы поросят 5, 30, 56 и 150 дней). Согласно проведенным ранее мониторинговым исследованиям в данном хозяйстве из патологического материала выделяется РНК РРСС, ДНК возбудителей гемофиллеза, парвовируса и цирковируса 2-го типа.

В качестве диагностических систем использовали системы, разработанные и разрабатываемые в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Согласно проведенным нами исследованиям из проб патологического материала от поросят с респираторной патологией наиболее часто выделяют следующих возбудителей: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, цирковир свиней 2-го типа, вирусы репродуктивного и респираторного синдрома свиней, реже – *Mycoplasma hyopneumoniae* и *Pasteurella multocida*, вирус болезни Ауески. Нами использованы диагностические системы на наиболее часто встречаемые инфекции: 3 бактериальные (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*) и 2 вирусные (циковир свиней 2-го типа – ДНК-вирус, вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней – РНК-вирус). Все исследования проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TagMan-зондов.

Для РНК-мишеней для одноэтапной RT-PCR смешивали 7,5 мкл буфера ОТ-ПЦР (2×), 0,12 мкл каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТФ, 0,6 мкл смеси ферментов ОТ-ПЦР (25×), 3 мкл РНК и не содержащую нуклеазы воду. Условия термоциклирования: 45 °С в течение 30 мин, 95 °С в течение 10 мин, затем 35 циклов при 95 °С в течение 15 с и 55 °С в течение 30 с. Сигнал флуоресценции регистрировали на шаге 55 °С в зеленом канале (470–510 нм).

Для ДНК-мишеней для RT-PCR смешивали 2,5 мкл буфера ПЦР (10×), 0,12 мкл

каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТФ, 1Ед Таг-полимеразы, 2 мкл ДНК и не содержащую нуклеазы воду. Условия термоциклирования: 95 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 95 °С в течение 15 с и 55 °С (бактериальные патогены) и 60 °С (вирусные патогены) в течение 30 с. Сигнал флуоресценции регистрировали на шаге 55 °С в зеленом канале (470–510 нм).

Концентрацию ДНК/РНК выделенных из проб измеряли на приборе Nanodrop. Наличие белковых и химических примесей определяли по соотношению длины волн 280/260 и 260/230.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно проведенным нами исследованиям более высокая концентрация суммарной ДНК выделялась набором фирмы «АртБиоТех», наименьшая концентрация суммарной ДНК наблюдалась при выделении ДНК из патологического материала набором «Рибосорб», соотношение белковых примесей и нуклеиновых кислот во всех случаях было больше 1,8, что говорит о достаточной для корректной постановки ПЦР степени очистки нуклеиновой кислоты от белковых примесей (таблица 1).

Однако визуально при выделении проб с наличием гемоглобина получали раствор выделенной ДНК/РНК соломенного цвета, дополнительная двукратная отмывка отмывочным буфером снижала интенсивность цвета, но при этом незначительно влияла на постановку ПЦР.

Соответственно, выбранные нами наборы позволяют выделять чистую суммарную ДНК для проведения ПЦР-исследований.

Наибольшее количество суммарной РНК выделялось набором фирмы «АртБиоТех», наименьшая концентрация наблюдалась при выделении РНК из патологического материала набором «Рибосорб», среднее соотношение белковых примесей и нуклеиновых кислот во всех случаях было больше 1,8.

Таблица 1. – Количество выделенной ДНК из патологического материала различными системами выделения

| Наименование биологического материала | Количество ДНК, нг/мкл |           |           |
|---------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|
|                                       | Ветфактор              | АртБиоТех | Амплисенс |
| Абортплод                             | 17,0                   | 925,0     | 77,5      |
| Мертворожденный                       | 477,0                  | 500,0     | 62,5      |
| 5 дней                                | 144,0                  | Н.и.      | 279,0     |
| 30 дней                               | 68,5                   | 760,0     | 164,0     |
| 56 дней                               | 791,0                  | 1292,0    | 82,0      |
| 150 дней                              | 728,0                  | 1453,0    | 397,0     |
| Среднее                               | 370,0                  | 986,0     | 177,0     |
| Соотношение 280/260                   | 2,0298                 | 2,06      | 1,972     |

Таблица 2. – Количество выделенной РНК из патологического материала различными системами выделения

| Наименование биологического материала | Количество РНК, нг/мкл |           |           |
|---------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|
|                                       | Ветфактор              | АртБиоТех | Амплисенс |
| Абортплод                             | 18,0                   | 488,0     | 184,0     |
| Мертворожденный                       | 398,0                  | 809,0     | 170,0     |
| 5 дней                                | 115,0                  | –         | 186,0     |
| 30 дней                               | 63,2                   | 620,0     | 57,2      |
| 56 дней                               | 671,0                  | 936,0     | 104,0     |
| 150 дней                              | 692,0                  | 928,0     | 350,0     |
| Среднее                               | 326,2                  | 756,2     | 175,2     |
| Соотношение 260/280                   | 2,07                   | 1,919     | 1,859     |

С помощью детальной оценки показателей каждой пробы установлено, что при измерении выделенной РНК количество белковых примесей несколько выше – до 30 % белка. Однако, скорее всего, это связано с несколькими циклами размораживания-оттаивания, что привело к частичной деградации РНК. При сравнении сохранности нуклеиновых кислот в растворах для элюции наиболее высокие показатели после нескольких циклов заморажива-

ния и оттаивания сохранил набор фирмы «Ветфактор» (2,0298 и 2,07 соответственно). При постановке ПЦР в режиме реального времени с праймерами к одной бактериальной и 2 вирусным инфекциям получены следующие результаты (рисунки 1–3).

Результаты ПЦР указывают на получение корректных результатов с ДНК/РНК всех трех систем выделения, при этом результаты коррелируют друг с другом (таблица 3).

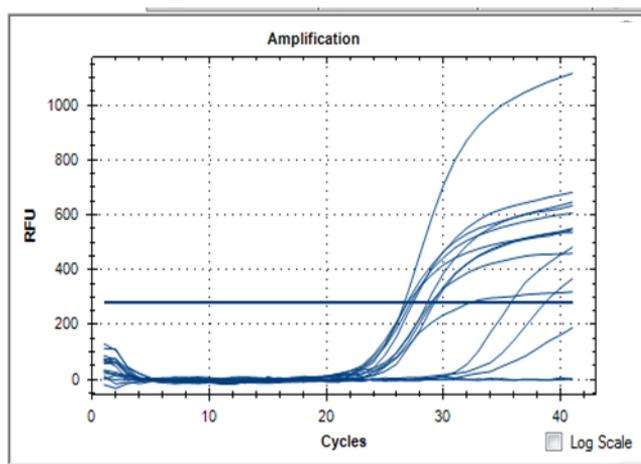
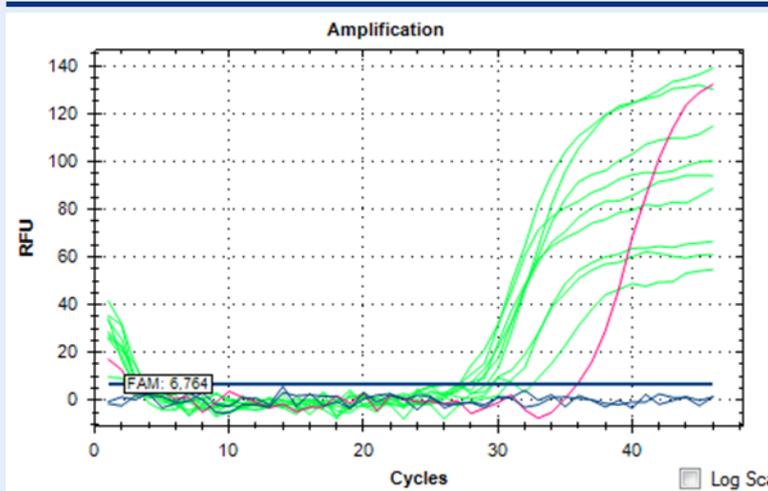
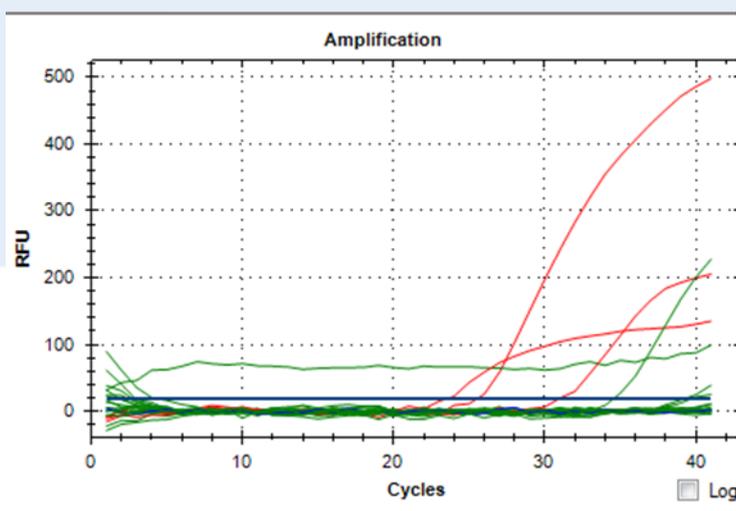


Рисунок 1. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием набора для обнаружения цирковируса 2-го типа



**Рисунок 2. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров к участку РНК ORF7 генома вируса РРСС**



**Рисунок 3. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров к участкам ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis***

Таблица 3. – Результаты ПЦР в режиме реального времени (значение Ct) по исследуемым видам инфекций

| Наименование биологического материала | Цирковирус 2-го типа |             |            | РРСС       |             |            | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (A), <i>Bordetella bronchiseptica</i> (B), <i>Haemophilus parasuis</i> (H) |             |            |
|---------------------------------------|----------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|---|-------------|------------|
|                                       | Вет-фактор           | Арт-Био-Тех | Ампли-сенс | Вет-фактор | Арт-Био-Тех | Ампли-сенс | Вет-фактор  | Арт-Био-Тех | Ампли-сенс |
| Абортплод                             | отриц.               | 32,71       | отриц.     | 33,70      | 34,49       | 39,47      | отриц.  | отриц.      | отриц.     |
| Мертворожденный                       | отриц.               | 32,55       | 30,59      | 35,15      | 34,26       | 29,73      | отриц.  | отриц.      | отриц.     |
| 5 дней                                | 34,68                | 33,60       | 31,67      | 28,34      | 28,67       | 29,25      | отриц.  | отриц.      | отриц.     |
| 30 дней                               | 26,55                | 27,02       | 29,54      | 31,80      | 31,99       | 30,93      | отриц.  | отриц.      | отриц.     |
| 56 дней                               | 32,96                | 28,59       | отриц.     | 30,44      | 30,23       | 31,13      | Н (34,12)   | Н (37,12)   | Н (37,06)  |
| 150 дней                              | 32,47                | 26,10       | 32,23      | 34,39      | 34,57       | отриц.     | отриц.  | отриц.      | отриц.     |
| Положительный контроль                | 24,7                 | 23,5        | 24,7       | 26,77      | 25,96       | 25,8       | полож.  | полож.      | полож.     |
| Отрицательный контроль                | отриц.               | отриц.      | отриц.     | отриц.     | отриц.      | отриц.     | отриц.  | отриц.      | отриц.     |

Как видно из таблицы 3, результаты незначительно отличаются друг от друга. Это может свидетельствовать о том, что количество целевой ДНК/РНК в выделенных пробах отличается незначительно и не влияет на выявление геномов возбудителей. Так, значение  $C_t$  при выявлении генома цирковируса из патологического материала от 30-дневных поросят составило 26,55 в пробах ДНК, выделенных набором фирмы «Ветфактор» (Россия); 27,02 – набором фирмы «АртБиоТех» (Беларусь), 29,54 – набором «Рибосорб» фирмы «Амплисенс» (Россия). Все пробы положительные и указывают на содержание количества генома в среднем  $10^6$  (двумя первыми наборами) и  $10^5$  (третьим набором), что, согласно литературным данным, говорит о наличии в хозяйстве животных с клинической и патологоанатомической картиной цирковиральной инфекции.

Постановка РТ ПЦР с выделенной из патологического материала РНК дало похожие результаты. Так, значение  $C_t$  в пробах с РНК, выделенной набором фирмы «Ветфактор», – 28,34, набором фирмы «АртБиоТех» – 28,67, набором «Рибосорб» фирмы «Амплисенс» – 29,25.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые в нашей работе системы позволяют выделить значительное количество тотальной ДНК/РНК, очищенной от белковых и химических примесей, содержащей достаточно целевой ДНК для обнаружения генома возбудителей PRDC-комплекса. Все три системы пригодны для выделения тотальной ДНК/РНК из патологического и биоматериала, которую в дальнейшем можно использовать для комплексной диагностики респираторной патологии свиней.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Конструирование тест-системы для обнаружения серовариантов A, B, D *Pasteurella multocida* в полимеразной цепной реакции / А. С. Андрусевич [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 43–48.
2. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark / M. S. Hansen [et al.] // *Comp Pathol*. – 2010, Aug-Oct. – P. 120–131.
3. Etiology of acute respiratory disease in fattening pigs in Finland / M. Haimi-Nakala [et al.] // *Porcine Health Manag.* – 2017. Published online 2017 Aug 23.
4. Лубенникова, М. В. Выделение ДНК – важный этап молекулярно-генетического исследования / М. В. Лубенникова, В. А. Афанасьев, К. А. Афанасьев // *Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ*. – 2020. – № 2 (21) апрель–июнь. – URL <http://e-journal.omgau.ru/images/issues/2020/2/00828>.
5. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе / Н. Е. Аукенов, М. Р. Масабаева, У. У. Хасанова // *Наука и здравоохранение*. – Семей : Государственный медицинский университет г. Семей. – 2014. – № 1. – С. 51–53.

## наша продукция

